



Facultad de Ciencias Experimentales

Participación del calcio en la ruta de señalización asociada a la deficiencia de boro en las raíces de *Arabidopsis thaliana*



Carlos Quiles Pando
Sevilla, 2015

Universidad Pablo de Olavide

**Participación del calcio en la ruta de señalización
asociada a la deficiencia de boro en las raíces de
*Arabidopsis thaliana***

Memoria que presenta

Carlos Quiles Pando
Para optar al título de Doctor

Directores del trabajo

Dr. Agustín González Fontes de Albornoz
Catedrático de Fisiología Vegetal

Dr. Jesús Rexach Benavides
Profesor Contratado
Doctor de Fisiología Vegetal

Dra. M^a Teresa Navarro Gochicoa
Profesora Titular de Universidad
de Fisiología Vegetal

Agradecimientos

En primer lugar quiero darles las gracias a los doctores D. Agustín González Fontes de Albornoz, D. Jesús Rexach Benavides y Dña. María Teresa Navarro Gochicoa, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, la cual no habría sido posible sin su esfuerzo y dedicación constantes. También a los doctores D. Juan José Camacho Cristóbal y Dña. María Begoña Herrera Rodríguez, miembros del Área de Fisiología Vegetal, por sus consejos y apoyo.

Hay muchas personas con las que he compartido muchas horas de trabajo durante todos estos años, y que han puesto su granito de arena de formas muy diferentes para que esta aventura tuviera un final feliz, por ese motivo quiero aprovechar la ocasión para agradecerse: a Macarena Martín, por todo lo que me ayudaste y me enseñaste cuando llegué al laboratorio; a Miguel Ángel Macho, mi compañero durante cinco años, por estar siempre dispuesto a colaborar en lo que fuera necesario; a Marta Fernández y Andrés Pedraza, por hacer el día a día en el laboratorio mucho más fácil y cómodo; a todos los alumnos internos, estudiantes de Proyecto Fin de Grado y Proyecto Fin de Máster, en especial a Nieves, Eva, Eugenio, Isa, Sofía, Alberto y Reme, por todo vuestro entusiasmo, alegría y ganas de aprender.

No puedo dejar de mostrar mi agradecimiento al Prof. Dr. Jörg Kudla (Universität Münster) y a los miembros de su grupo de investigación (Katrin, Jan-Niklas, Anëtte y Leonie, sobre todo) por permitirme realizar una estancia en su laboratorio, imprescindible para la consecución de esta investigación. También a D. Pedro Preciado y su grupo de investigación de la Universidad Pública de Navarra, por los análisis de cationes; a D. Carlos Santos Ocaña, por el uso de la ultracentrífuga; a D. José Antonio Sánchez Alcázar, por el uso del liofilizador; a D. Federico Valverde, por múltiples y variados motivos; a Dña. Cecilia Gotor, por sus consejos sobre el trabajo con proteínas y al servicio de microscopía del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, especialmente a Kathy y Lesly.

Quiero darle las gracias de una manera muy especial a mi amiga Gloria, no sólo por todo lo que me has ayudado dentro del laboratorio y en el diseño de la figura final,

sino por todo lo que has hecho por mí, por tu apoyo, por tus ánimos, por todos los buenos momentos vividos, por escucharme siempre que necesitaba alguien con quien hablar, por darme otro punto de vista, por creer en mí, por encontrar las palabras adecuadas y por ser capaz de comprenderme. Muchas gracias de corazón, nunca lo olvidaré.

Finalmente, tengo que darle las gracias a mi familia, especialmente a mis padres, María de los Ángeles y Luis, por darme la oportunidad de seguir con mis estudios y respetar mis decisiones y, sobre todo a ti, mamá, por quererme, cuidarme y darme todo lo que tienes para que haya llegado donde estoy y sea la persona que soy, todo te lo debo a ti. GRACIAS. También quiero dar las gracias a mi hermano Luis y a su mujer Macarena, sois los mejores hermanos que nunca pude imaginar. Y por último quiero recordar a todos los que ya no se encuentran con nosotros pero que siempre estarán conmigo, gracias.

Las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis doctoral han sido financiadas por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-08397 y BFU2012-37445) y por la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (BIO-266 y P09-CVI-4721). Por último, quiero agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador.

ÍNDICE

<u>Abreviaturas</u>	1
<u>Índice de Tablas y Figuras</u>	5
 <u>I. INTRODUCCIÓN</u>	13
<u>I.1. EL BORO</u>	14
<u>I.1.1. El boro en el suelo y su importancia en la agricultura</u>	14
<u>I.1.2. Función del boro en los tejidos vegetales</u>	15
<u>I.1.3. Transporte de boro en las plantas: absorción y distribución</u>	17
<u>I.1.4. Efectos de la deficiencia de boro en las plantas vasculares</u>	19
<u>I.1.4.1. Efectos en el crecimiento reproductivo</u>	19
<u>I.1.4.2. Efectos en el crecimiento vegetativo</u>	20
<u>I.1.4.3. Efectos en el metabolismo del nitrógeno</u>	21
<u>I.1.4.4. Efectos en la fotosíntesis</u>	22
<u>I.1.4.5. Efectos en el estado redox</u>	22
<u>I.1.4.6. Efectos en el metabolismo secundario</u>	23
<u>I.1.4.7. Efectos en la expresión génica</u>	24
<u>I.1.5. Transmisión de la señal de deficiencia de boro</u>	24
<u>I.2. EL CALCIO</u>	26
<u>I.2.1. El calcio en las células vegetales</u>	26
<u>I.2.2. Cambios en la homeostasis de calcio</u>	27
<u>I.2.2.1. Monitorización de los cambios en la homeostasis de calcio</u>	29

I.2.3. <u>Interacción entre ácido abscísico, especies reactivas de oxígeno y calcio</u>	31
I.2.4. <u>Agentes modificadores de la homeostasis de calcio: U73122 y EGTA</u>	32
I.2.5. <u>Relación calcio-boro</u>	33
I.3. <u>EL POTASIO</u>	34
I.3.1. <u>El potasio en las células vegetales</u>	34
I.3.2. <u>El transporte de potasio en las plantas</u>	35
II. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	38
II.1. <u>MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO</u>	39
II.2. <u>RECOGIDA Y PROCESADO DEL MATERIAL VEGETAL</u>	41
II.3. <u>EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE RNA</u>	41
II.4. <u>ANÁLISIS POR MICROARRAYS</u>	44
II.5. <u>SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)</u>	44
II.5.1. <u>Diseño de cebadores</u>	46
II.6. <u>PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (Q-RT-PCR)</u>	46
II.7. <u>OBTENCIÓN DE MUTANTES HOMOCIGÓTICOS INSERCIONALES</u>	50
II.8. <u>OBTENCIÓN MEDIANTE CRUCES GENÉTICOS DE MUTANTES HOMOCIGÓTICOS INSERCIONALES QUE CONTIENEN LA CONSTRUCCIÓN YC3.6</u>	52
II.9. <u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</u>	53
II.9.1. <u>Expresión génica en los mutantes <i>cax3</i> y <i>cnqc19</i></u>	53
II.9.2. <u>Expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de EGTA, ABA o U73122</u>	53

II.10. <u>EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS</u>	53
II.10.1. <u>Obtención de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana</u>	53
II.10.2. <u>Diseño de anticuerpos primarios</u>	54
II.10.3. <u>Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</u>	55
II.10.4. <u>Análisis de proteínas mediante Western-Blot</u>	55
II.11. <u>ANÁLISIS HISTOQUÍMICO</u>	57
II.12. <u>EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE BORO</u>	58
II.12.1. <u>Determinación de boro soluble</u>	58
II.12.2. <u>Determinación de boro insoluble</u>	59
II.13. <u>CUANTIFICACIÓN DE CATIONES MEDIANTE CROMATOGRFÍA IÓNICA</u>	59
II.14. <u>ANÁLISIS MORFOLÓGICOS DE LAS RAÍCES PRINCIPALES</u>	60
II.15. <u>ANÁLISIS MORFOLÓGICOS DE LOS ÁPICES</u>	60
II.15.1. <u>Cuantificación del grosor apical</u>	61
II.15.2. <u>Análisis de la morfología apical</u>	61
II.16. <u>ANÁLISIS DEL CALCIO CITOSÓLICO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL</u>	61
II.16.1 <u>Análisis de la línea transgénica Col0::YC3.6</u>	61
II.16.2. <u>Imágenes en microscopio confocal en presencia de diversos compuestos</u>	62
II.16.3. <u>Imágenes en microscopio confocal con recuperación de boro</u>	62
II.16.4. <u>Imágenes en microscopio confocal de diferentes mutantes</u>	63
II.17. <u>ANÁLISIS DEL CALCIO CITOSÓLICO MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA</u>	63

II.18. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	64
III. <u>RESULTADOS</u>	65
III.1. <u>EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA</u>	66
III.1.1. <u>Análisis de la expresión génica mediante microarrays</u>	66
III.1.2. <u>Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre mediante Q-RT-PCR</u>	68
III.1.2.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}	68
III.1.2.2. Genes relacionados con el transporte de boro.....	75
III.1.2.3. Genes relacionados con el transporte de potasio.....	75
III.1.2.4. Genes que codifican factores de transcripción.....	77
III.1.3. <u>Análisis de la expresión génica en el mutante <i>cax3</i> mediante Q-RT-PCR</u>	79
III.1.3.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}	79
III.1.3.2. Genes relacionados con el transporte de boro.....	84
III.1.3.3. Genes relacionados con el transporte de potasio.....	85
III.1.3.4. Genes que codifican factores de transcripción.....	87
III.1.4. <u>Análisis de la expresión génica en el mutante <i>cnqc19</i> mediante Q-RT-PCR</u>	89
III.1.4.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}	89
III.1.4.2. Genes relacionados con el transporte de boro.....	94
III.1.4.3. Genes relacionados con el transporte de potasio.....	95
III.1.4.4. Genes que codifican factores de transcripción.....	97
III.1.5. <u>Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de EGTA</u>	99

III.1.5.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}	99
III.1.5.2. Genes que codifican factores de transcripción.....	103
III.1.6. <u>Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de ABA</u>.....	105
III.1.6.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}	105
III.1.6.2. Genes que codifican factores de transcripción.....	109
III.1.7. <u>Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de U73122</u>.....	111
III.1.7.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}	111
III.1.7.2. Genes que codifican factores de transcripción.....	115
III.1.8. <u>Análisis de la expresión de los promotores mediante el ensayo histoquímico de la enzima β-glucuronidasa</u>.....	117
III.2. <u>EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE DIVERSOS NUTRIENTES</u>.....	127
III.2.1. <u>Contenidos de boro soluble, insoluble y total</u>	127
III.2.2. <u>Contenidos de cationes: Ca^{2+}, Mg^{2+}, NH_4^+, K^+ y Na^+</u>	129
III.3. <u>EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA MORFOLOGÍA DE LA RAÍZ PRINCIPAL</u>.....	134
III.3.1. <u>Crecimiento longitudinal de la raíz principal</u>	134
III.3.2. <u>Grosor del ápice de la raíz principal</u>	136
III.3.3. <u>Morfología del ápice de la raíz principal</u>	138
III.4. <u>EFFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE LOS NIVELES DE CALCIO CITOSÓLICO EN LA RAÍZ PRINCIPAL</u>.....	140
III.4.1. <u>Análisis de los niveles de calcio citosólico mediante microscopia confocal</u>	140
III.4.1.1. Genotipo Col0::YC3.6.....	140

III.4.1.2. Genotipos mutantes.....	144
III.4.1.3. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de ABA.....	146
III.4.1.4. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de EGTA.....	148
III.4.1.5. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de ABA y EGTA.....	150
III.4.1.6. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de U73122.....	151
III.4.1.7. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de U73122 y EGTA....	154
III.4.2. <u>Análisis de los niveles de calcio citosólico en el genotipo Col0::YC3.6 mediante microscopia de epifluorescencia</u>	156
III.5. <u>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ACA10, CAX3 Y CNGC19 EN EL GENOTIPO SILVESTRE MEDIANTE WESTERN-BLOT</u>	157
IV. <u>DISCUSIÓN</u>	158
IV.1. <u>LA DEFICIENCIA EN BORO AFECTA A LA EXPRESIÓN DE GENES EN LAS RAÍCES DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS</u>	159
IV.1.1. <u>Expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la señalización de calcio</u>	159
IV.1.2. <u>Expresión de genes que codifican factores de transcripción</u>	164
IV.2. <u>LA DEFICIENCIA EN BORO ALTERA LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO EN LA RAÍZ PRINCIPAL DE ARABIDOPSIS</u>	166
IV.2.1. <u>Efecto de la deficiencia en boro sobre la concentración de calcio citosólico</u>	166
IV.2.2. <u>Efecto de la deficiencia en boro sobre la concentración de calcio citosólico en presencia de compuestos que afectan la homeostasis del calcio</u>	167
IV.2.3. <u>Efecto de la deficiencia en boro sobre la concentración de calcio citosólico en la raíz principal de diferentes mutantes</u>	169

<u>IV.3. LA DEFICIENCIA EN BORO AFECTA AL PERFIL IÓNICO EN LAS RAÍCES DE ARABIDOPSIS</u>	170
IV.3.1. <u>Concentración de boro soluble, insoluble y total</u>	171
IV.3.2. <u>Concentración de Ca^{2+}</u>	171
IV.3.3. <u>Concentración de Mg^{2+}</u>	172
IV.3.4. <u>Concentración de K^{+}</u>	173
IV.3.5. <u>Concentración de Na^{+}</u>	173
<u>IV.4. LA DEFICIENCIA EN BORO AFECTA AL CRECIMIENTO Y A LA MORFOLOGÍA DE LA RAÍZ PRINCIPAL DE ARABIDOPSIS</u>	174
IV.4.1. <u>Efecto sobre el crecimiento de la raíz principal</u>	174
IV.4.2. <u>Efectos sobre la formación de pelos radicales y la morfología apical de la raíz</u>	175
<u>IV.5. PARTICIPACIÓN DEL CALCIO EN LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL DE DEFICIENCIA DE BORO A CORTO PLAZO EN LA RAÍZ PRINCIPAL DE ARABIDOPSIS: MODELO HIPOTÉTICO</u>	176
<u>V. CONCLUSIONES</u>	178
<u>VI. BIBLIOGRAFÍA</u>	181

[Ca²⁺]_{cit}: concentración de calcio citosólico

µg: microgramo

µL: microlitro

µM: micromolar

µmol: micromol

A: amperio

ABA: ácido abscísico

AMPC: adenosín monofosfato cíclico

APS: persulfato amónico

ATP: adenosín trifosfato

B: boro

BY-2: células Bright Yellow 2 de la estirpe *Nicotiana tabacum*

Ca²⁺: catión calcio

CaM: calmodulina

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

CFP: proteína fluorescente cian

cm: centímetro

Col-0: estirpe silvestre Columbia-0

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DAG: 1,2-diacilglicerol

DEPC: dietilpirocarbonato

DMF: dimetil formamida

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DPI: iodonio de difenilo

DTT: ditioneitol

dTT18: oligo dT de 18 pares de bases

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: ácido etilenglicoltetraacético

FC: proporción señal muestras deficientes en B/señal muestras suficientes en B

FRET: transferencia de energía por resonancia de fluorescencia

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GUS: gen reportero de la β -glucuronidasa

h: hora

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

Hz: herzio

IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato

K⁺: catión potasio

kDa: kilodalton

kg: kilogramo

L: litro

m: metro

M: molar

M13: miosina de cadena ligera

MES: 2-(N-morfolino)

mg: miligramo

Mg²⁺: catión magnesio

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

M-MuLV: transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

Na⁺: catión sodio

NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)

NH₄⁺: catión amonio

nm: nanómetro

nM: nanomolar

nmol: nanomol

p/v: proporción peso/volumen

pb: par de bases

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PLC: fosfolipasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfónico

PS: peso seco

PVDF: polifluoruro de vinilideno

PVP: poli(vinilpirrolidona)

PVPP: poli(vinilpolipirrolidona)

Q-RT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real

RG-II: ramnogalacturonano II

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especie reactiva de oxígeno

s: segundo

SDS: dodecilsulfato sódico

TAE: buffer Tris-acetato

Taq: DNA polimerasa de *Termophilus aquaticus*

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina

U: unidad

v/v: proporción volumen/volumen

V: voltio

YC3.6: Yellow Cameleon 3.6

YFP: proteína fluorescente amarilla

Figura 1	Ácido bórico (A), anión borato (B) y sus respectivos ésteres diol (C y D). Complejo de la pared celular boro-ramnogalacturonano II (E).....	16
Figura 2	Modelo esquemático del transporte de B en la célula vegetal.....	18
Figura 3	Clasificación de las proteínas sensoras de calcio.....	29
Figura 4	Esquema de la construcción YC3.6.....	30
Figura 5	Efecto de los niveles de Ca^{2+} sobre la emisión de fluorescencia en YC3.6 (verde, alto nivel de Ca^{2+} ; amarillo, bajo nivel de Ca^{2+}).....	31
Tabla 1	Líneas de mutantes homocigóticos por inserción de T-DNA procedentes del NASC.....	39
Tabla 2	Composición del medio de cultivo sólido estéril empleado para el cultivo de plantas de arabidopsis.....	40
Tabla 3	Cebadores de los genes de arabidopsis analizados por Q-RT-PCR.....	48
Tabla 4	Cebadores empleados para la determinación de mutantes homocigóticos insercionales.....	51
Tabla 5	Expresión diferencial de genes involucrados en la señalización de Ca^{2+} , transporte de B y de potasio y factores de transcripción en las raíces de plantas de arabidopsis.....	66
Figura 6	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CAX3</i> (A) y <i>CNGC19</i> (B) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	68
Figura 7	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>ACA1</i> (A), <i>ACA10</i> (B), <i>ACA12</i> (C) y <i>ACA13</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	69
Figura 8	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CML12</i> (A), <i>CML24</i> (B), <i>CML45</i> (C) y <i>CML47</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	70
Figura 9	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CBL1</i> (A), <i>CBL3</i> (B), <i>CBL4</i> (C), <i>CBL9</i> (D), <i>CBL10</i> (E) y <i>CIPK23</i> (F) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	72

Figura 10	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CPK28</i> (A) y <i>CPK29</i> (B) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	73
Figura 11	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>ATANN2</i> (A) y <i>PBP1</i> (B) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	74
Figura 12	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>BOR1</i> (A) y <i>NIP5;1</i> (B) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	75
Figura 13	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>AKT1</i> (A), <i>HAK5</i> (B) y <i>SKOR</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	76
Figura 14	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>bZIP34</i> (A), <i>bZIP61</i> (B), <i>MYB14</i> (C), <i>MYB15</i> (D), <i>GATA4</i> (E) y <i>WRKY46</i> (F) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	78
Figura 15	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>ACA10</i> (A) y <i>CNGC19</i> (B), en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cax3</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	80
Figura 16	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CBL1</i> (A), <i>CBL4</i> (B), <i>CBL9</i> (C) y <i>CIPK23</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cax3</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	81
Figura 17	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CPK28</i> (A), <i>CPK29</i> (B) y <i>CML24</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cax3</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	83
Figura 18	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>BOR1</i> (A) y <i>NIP5;1</i> (B), en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cax3</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	84
Figura 19	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>AKT1</i> (A), <i>HAK5</i> (B) y <i>SKOR</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cax3</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	86

Figura 20	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>bZIP34</i> (A), <i>GATA4</i> (B), <i>MYB15</i> (C) y <i>WRKY46</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cax3</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	88
Figura 21	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>ACA10</i> (A) y <i>CAX3</i> (B), en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cngc19</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	89
Figura 22	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CBL1</i> (A), <i>CBL4</i> (B), <i>CBL9</i> (C) y <i>CIPK23</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cngc19</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	91
Figura 23	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CPK28</i> (A), <i>CPK29</i> (B) y <i>CML24</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cngc19</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	93
Figura 24	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>BOR1</i> (A) y <i>NIP5;1</i> (B), en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cngc19</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	94
Figura 25	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>AKT1</i> (A), <i>HAK5</i> (B) y <i>SKOR</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cngc19</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	96
Figura 26	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>bZIP34</i> (A), <i>GATA4</i> (B), <i>MYB15</i> (C) y <i>WRKY46</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis en los genotipos silvestre y mutante <i>cngc19</i> , sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h.....	98
Figura 27	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>ACA10</i> (A), <i>CAX3</i> (B), <i>CNGC19</i> (C), <i>CML24</i> (D), <i>CPK28</i> (E) y <i>CPK29</i> (F) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de EGTA 1 mM.....	100
Figura 28	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CBL1</i> (A), <i>CBL4</i> (B) y <i>CBL9</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de EGTA 1 mM.....	102

Figura 29	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>bZIP34</i> (A), <i>GATA4</i> (B), <i>MYB15</i> (C) y <i>WRKY46</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de EGTA 1 mM.....	104
Figura 30	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>ACA10</i> (A), <i>CAX3</i> (B), <i>CNGC19</i> (C), <i>CML24</i> (D), <i>CPK28</i> (E) y <i>CPK29</i> (F) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h, en presencia o no de metanol o ABA 5 μ M.....	106
Figura 31	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CBL1</i> (A), <i>CBL4</i> (B) y <i>CBL9</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h, en presencia o no de metanol o ABA 5 μ M.....	108
Figura 32	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>bZIP34</i> (A), <i>GATA4</i> (B), <i>MYB15</i> (C) y <i>WRKY46</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h, en presencia o no de metanol o ABA 5 μ M.....	110
Figura 33	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>ACA10</i> (A), <i>CAX3</i> (B), <i>CNGC19</i> (C), <i>CML24</i> (D), <i>CPK28</i> (E) y <i>CPK29</i> (F) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 o 24 h, en presencia o no de DMSO o U73122 5 μ M.....	112
Figura 34	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>CBL1</i> (A), <i>CBL4</i> (B) y <i>CBL9</i> (C) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 o 24 h, en presencia o no de DMSO o U73122 5 μ M.....	114
Figura 35	Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes <i>bZIP34</i> (A), <i>GATA4</i> (B), <i>MYB15</i> (C) y <i>WRKY46</i> (D) en las raíces de plantas de arabidopsis, sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 o 24 h, en presencia o no de DMSO o U73122 5 μ M.....	116
Figura 36	Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión de la línea reportera pACA10::GUS en las raíces de plantas de arabidopsis.....	118
Figura 37	Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión de la línea reportera pCML12::GUS en las raíces de plantas de arabidopsis.....	120
Figura 38	Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión de la línea reportera pCML24::GUS en las raíces de plantas de arabidopsis.....	122

Figura 39	Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión de la línea reportera pCPK28::GUS en las raíces de plantas de arabidopsis.....	124
Figura 40	Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión de la línea reportera pMYB15::GUS en las raíces de plantas de arabidopsis.....	126
Figura 41	Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de B soluble (A), insoluble (B) y total (C) en las raíces de arabidopsis de los genotipos silvestre y Col0::YC3.6 sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h.....	128
Figura 42	Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de calcio en las raíces de plantas de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, <i>cbl1/4/5/9</i> , <i>aca10</i> , <i>cax3</i> y <i>cngc19</i> sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h.....	129
Figura 43	Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de magnesio en las raíces de plantas de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, <i>cbl1/4/5/9</i> , <i>aca10</i> , <i>cax3</i> y <i>cngc19</i> sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h.....	130
Figura 44	Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de amonio en las raíces de plantas de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, <i>cbl1/4/5/9</i> , <i>aca10</i> , <i>cax3</i> y <i>cngc19</i> sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h.....	131
Figura 45	Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de potasio en las raíces de plantas de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, <i>cbl1/4/5/9</i> , <i>aca10</i> , <i>cax3</i> y <i>cngc19</i> sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h.....	132
Figura 46	Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de sodio en las raíces de plantas de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, <i>cbl1/4/5/9</i> , <i>aca10</i> , <i>cax3</i> y <i>cngc19</i> sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h.....	133
Figura 47	Efecto de la deficiencia de B sobre la longitud de la raíz principal de plantas de arabidopsis de los genotipos: Col-0 (A), <i>aca10</i> (B), <i>cax3</i> (C), <i>cbl 1/4/5/9</i> (D), <i>cml24</i> (E), <i>cngc19</i> (F), <i>gata4</i> (G), <i>myb15</i> (H) y <i>wrky46</i> (I), sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24, 48, 72 y 96 h.....	135

- Figura 48** Efecto de la deficiencia de B sobre el diámetro del ápice de la raíz principal de arabidopsis, en los genotipos: Col-0 (A), *bzip34* (B), *cbl1/4/5/9* (C), *gata4* (D), *myb15* (E) y *wrky46* (F) sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h.....137
- Figura 49** Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología del ápice de la raíz principal de arabidopsis de los genotipos Col-0 (A, B), *bzip34* (C, D), *cbl1/4/5/9* (E, F), *gata4* (G, H), *myb15* (I, J) y *wrky46* (K, L) tratados con B 2 μ M (A, C, E, G, I, K) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J, L).....139
- Figura 50** Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal de plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C) o en deficiencia de B (B, D) durante 6 (A, B) o 24 h (C, D).....141
- Figura 51** Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal de plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C) o en deficiencia de B (B, D) durante 6 (A, B) o 24 h (C, D).....142
- Figura 52** Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, B, C, D) o en deficiencia de B (E, F, G, H) durante 24 h y, posteriormente, tratadas con B 2 μ M durante 1 (A, E), 3 (B, F), 6 (C, G) o 24 h (D, H).....143
- Figura 53** Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, B, C, D) o en deficiencia de B (E, F, G, H) durante 24 h y, posteriormente, tratadas con B 2 μ M durante 1 (A, E), 3 (B, F), 6 (C, G) o 24 h (D, H).....144
- Figura 54** Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal de arabidopsis de los genotipos Col0::YC3.6 (A, B), *aca10*::YC3.6 (C, D), *cax3*::YC3.6 (E, F), *cbl1/4/5/9*::YC3.6 (G, H), *cngc19*::YC3.6 (I, J), *cml24*::YC3.6 (K, L), *cpk28*::YC3.6 (M, N), *cpk29*::YC3.6 (Ñ, O), *bzip34*::YC3.6 (P, Q), *gata4*::YC3.6 (R, S), *myb15*::YC3.6 (T, U) y *wrky46*::YC3.6 (V, W) tratados con B 2 μ M (A, C, E, G, I, K, M, Ñ, P, R, T, V) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J, L, N, O, Q, S, U, W) durante 24 h.....145
- Figura 55** Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis de los genotipos Col0::YC3.6 (A, B), *aca10*::YC3.6 (C, D), *cax3*::YC3.6 (E, F), *cbl1/4/5/9*::YC3.6 (G, H), *cngc19*::YC3.6 (I, J), *cml24*::YC3.6 (K, L), *cpk28*::YC3.6 (M, N), *cpk29*::YC3.6 (Ñ, O), *bzip34*::YC3.6 (P, Q), *gata4*::YC3.6 (R, S), *myb15*::YC3.6 (T, U) y *wrky46*::YC3.6 (V, W) tratados con B 2 μ M (A, C, E, G, I, K, M, Ñ, P, R, T, V) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J, L, N, O, Q, S, U, W) durante 24 h.....146

Figura 56	Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μM	147
Figura 57	Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μM	148
Figura 58	Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de EGTA 1 mM.....	149
Figura 59	Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de EGTA 1 mM.....	149
Figura 60	Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μM y EGTA 1 mM.....	150
Figura 61	Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μM y EGTA 1 mM.....	151
Figura 62	Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 5 μM	152
Figura 63	Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 5 μM	152
Figura 64	Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μM	153

Figura 65	Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μ M.....	154
Figura 66	Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μ M y EGTA 1 mM.....	155
Figura 67	Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H) en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μ M y EGTA 1 mM.....	155
Figura 68	Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H).....	156
Figura 69	Análisis de los niveles de la proteína ACA10 (A), CAX3 (B) y CNGC19 (C) en las raíces de plántulas de arabidopsis cultivadas con B 2 μ M.....	157
Figura 70	Mecanismo propuesto para la respuesta de las raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> a la deficiencia de B.....	177

I. INTRODUCCIÓN

I.1. EL BORO

I.1.1. El boro en el suelo y su importancia en la agricultura

El boro (B) es el elemento más electronegativo del grupo 13 (período 2) de la Tabla Periódica y presenta propiedades intermedias entre los metales y los no-metales; forma parte del grupo de los metaloides, los cuales suelen ser semiconductores.

La concentración de B en nuestro planeta es muy baja; sin embargo, está ampliamente distribuido tanto en la litosfera como en la hidrosfera, con unas concentraciones que oscilan entre 5-10 mg/kg en las rocas (Shorrocks, 1997), 3-30 µg/kg en los ríos (Power y Woods, 1997) y 4-5 mg/L en los océanos (Lemarchand et al., 2000).

En condiciones fisiológicas y en ausencia de interacción con otras biomoléculas, el B puede encontrarse en las plantas en forma de ácido bórico (H_3BO_3) o de anión borato $[\text{B}(\text{OH})_4]^-$ (Woods, 1996).



El ácido bórico es un ácido muy débil, como indica su pK_a , y al pH del citoplasma ($\sim 7,5$) aproximadamente el 98 % se encuentra en su forma ácida. Este porcentaje es todavía mayor en el apoplasto ($\text{pH} \sim 5,5$), donde más del 99,5 % del B está como ácido y el resto como anión borato (Woods, 1996). Tanto en su forma de ácido como de borato, el B puede reaccionar con una gran variedad de moléculas biológicas y, en condiciones normales, la cantidad de B unido a otras moléculas será superior a la de B libre.

La disponibilidad de B en el suelo se puede ver afectada por muchos factores, tales como pH, textura, temperatura y contenido de materia orgánica, entre otros (Goldberg, 1997), siendo el primero el más importante. En los suelos neutros o ligeramente ácidos, el B se encuentra en su forma de ácido bórico y puede ser absorbido por las raíces de las plantas (Hu y Brown, 1997; Power y Woods, 1997). En esta forma se lixivia fácilmente en condiciones de alta pluviosidad, lo cual provoca deficiencias de este nutriente en las plantas que se encuentran en estas regiones. Por

el contrario, en condiciones de bajas precipitaciones el B no se lixivia y puede alcanzar niveles tóxicos para las plantas (Reid, 2007).

El B fue reconocido como un nutriente esencial para las plantas por Warington en 1923, y desde entonces se sabe que un aporte adecuado de este elemento es necesario para alcanzar altos rendimientos y calidades en los cultivos (Brown et al., 2002; Goldbach y Wimmer, 2007).

Entre los efectos fisiológicos de la deficiencia de B se encuentran: inhibición del crecimiento y extensión apical, necrosis de las yemas terminales, fractura de los vástagos, inhibición de la formación de nuevas flores y daños en los frutos (Mozafar, 1993; Goldbach, 1997). Por tanto, la deficiencia de B es un problema que tiene un fuerte impacto mundial en la agricultura pues también afecta a las estructuras reproductivas, que representan el 80 % de los productos agrícolas a escala mundial (Hopmans y Flinn, 1984; Ram et al., 1989; Dell y Malajczuk, 1994; Shorrocks, 1997; Wei et al., 1998; Pérez-Castro et al., 2012; Chatterjee et al., 2014; Liu et al., 2015). Igualmente, muchas especies de interés agronómico son sensibles a concentraciones elevadas de B en el suelo y en el agua, por lo que en regiones con escasas precipitaciones se dan casos de inhibición del crecimiento a causa de la excesiva absorción de B por las plantas (Kumar et al., 2014; Pallotta et al., 2014).

Además, el B se ha reconocido como un micronutriente necesario para otros organismos (Devirian y Volpe, 2003), ya que se ha demostrado la importancia nutricional del B en levaduras (Bennett et al., 1999) y humanos (Nielsen, 2002). No obstante, su abundancia en frutas y semillas hace que la deficiencia de B sea rara en los animales.

I.1.2. Función del boro en los tejidos vegetales

El B, tanto en su forma de ácido bórico como de borato, es capaz de formar complejos con una gran variedad de compuestos biológicos que en su estructura química contienen dos grupos hidroxilo en configuración *cis* (**Figura 1**). La principal función del B en las plantas vasculares está relacionada con la pared celular, ya que se

establecen enlaces éster entre el anión borato y los residuos de apiosa del ramnagalacturonano II (RG-II) (**Figura 1E**); la construcción de este complejo es fundamental para la estructura y función de la pared celular (O'Neill et al., 2004), que es crítica en los tejidos en crecimiento. El hecho de que el B tenga una movilidad muy reducida en la mayoría de las plantas (Brown y Shelp, 1997), junto con su función estructural, supone que sea necesario su aporte continuo, por lo que el control del B en el suelo es de gran importancia agronómica.

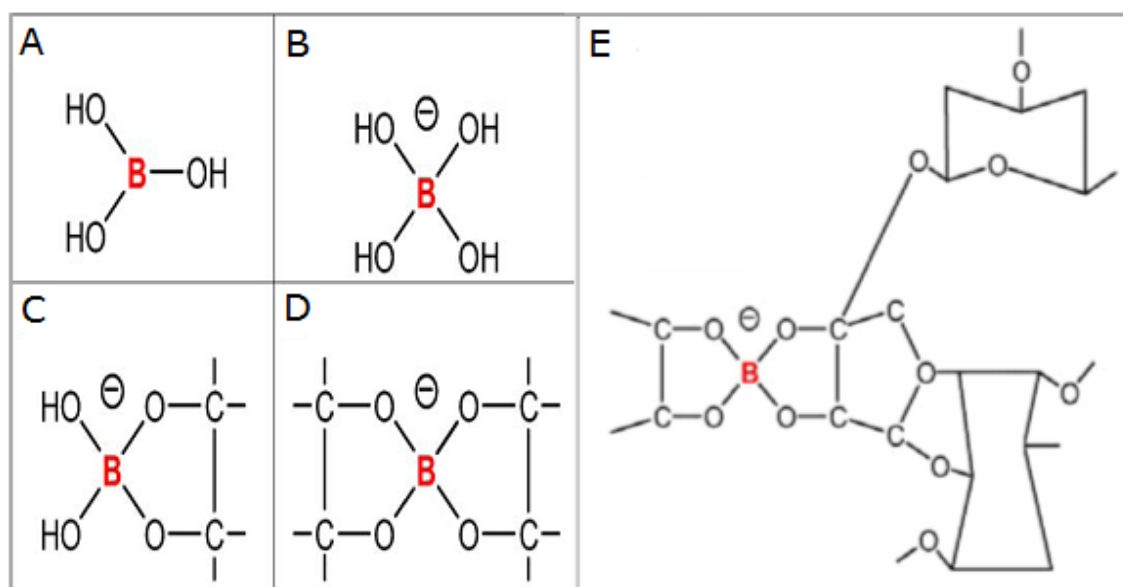


Figura 1. Ácido bórico (A), anión borato (B) y sus respectivos ésteres diol (C y D). Complejo de la pared celular boro-ramnagalacturonano II (E) (Bolaños et al., 2004).

Diferentes estudios han mostrado que el B participa en la función de proteínas de la membrana plasmática, en los procesos de transporte a través de ella y en la integridad de la membrana (Cakmak y Römheld, 1997; Goldbach et al., 2001; Brown et al., 2002; Martínez-Ballesta et al., 2008; Redondo-Nieto et al., 2008; Wimmer et al., 2009). Por ejemplo, la deficiencia de B altera el potencial de membrana (Blaser-Grill et al., 1989) y reduce la actividad de las H⁺-ATPasa y, por tanto, el gradiente de protones a través de la membrana plasmática (Ferrol y Donaire, 1992; Obermeyer et al., 1996).

I.1.3. Transporte de boro en las plantas: absorción y distribución

Se han descrito tres mecanismos diferentes que explicarían el transporte de B desde el suelo hacia las células de las raíces y su posterior carga en el xilema (Reid, 2014) (**Figura 2**):

a) La incorporación pasiva por difusión a través del plasmalema es el principal mecanismo de absorción de B bajo condiciones de suficiencia o exceso de ácido bórico (Miwa y Fujiwara, 2010); este proceso se restringe a la forma sin disociar de esta molécula.

b) El segundo mecanismo propuesto es la incorporación de B por difusión facilitada a través de canales. Las acuaporinas son canales proteicos que median el transporte de agua o pequeños solutos neutros (Maurel et al., 2008). Estos canales se pueden dividir en 4 subfamilias, siendo las NIP (proteínas intrínsecas similares a la nodulina 26) una de ellas. A su vez, las NIP se subdividen en tres subgrupos: I, II y III, que se diferencian en los sustratos de transporte. El ácido bórico es transportado por las NIP II (Takano et al., 2006). NIP5;1 fue el primer canal identificado en *Arabidopsis thaliana* que facilita la incorporación de B en condiciones limitantes, y se encuentra localizado en el plasmalema de las células epidérmicas, corticales y de la endodermis de la zona de elongación de la raíz y de los pelos radicales (Takano et al., 2006). NIP5;1 es permeable tanto a ácido bórico como a agua (Miwa y Fujiwara, 2010), y se sobreexpresa en condiciones de deficiencia de B; su regulación es a nivel transcripcional (Takano et al., 2006).

c) En condiciones de baja disponibilidad de B se ha descrito un transporte activo de alta afinidad dependiente de energía (Dannel et al., 2000), que está mediado por transportadores tipo BOR (Takano et al., 2002; Miwa et al., 2007; Miwa et al., 2013). BOR1 es un transportador que se encarga del transporte del B desde la raíz hasta el xilema, y está sobreexpresado en deficiencia de B. Se expresa predominantemente en la membrana plasmática de las células del periciclo de la raíz –alrededor del xilema–, aunque también en los tallos, y su regulación es a nivel post-transcripcional (Miwa y Fujiwara, 2010).

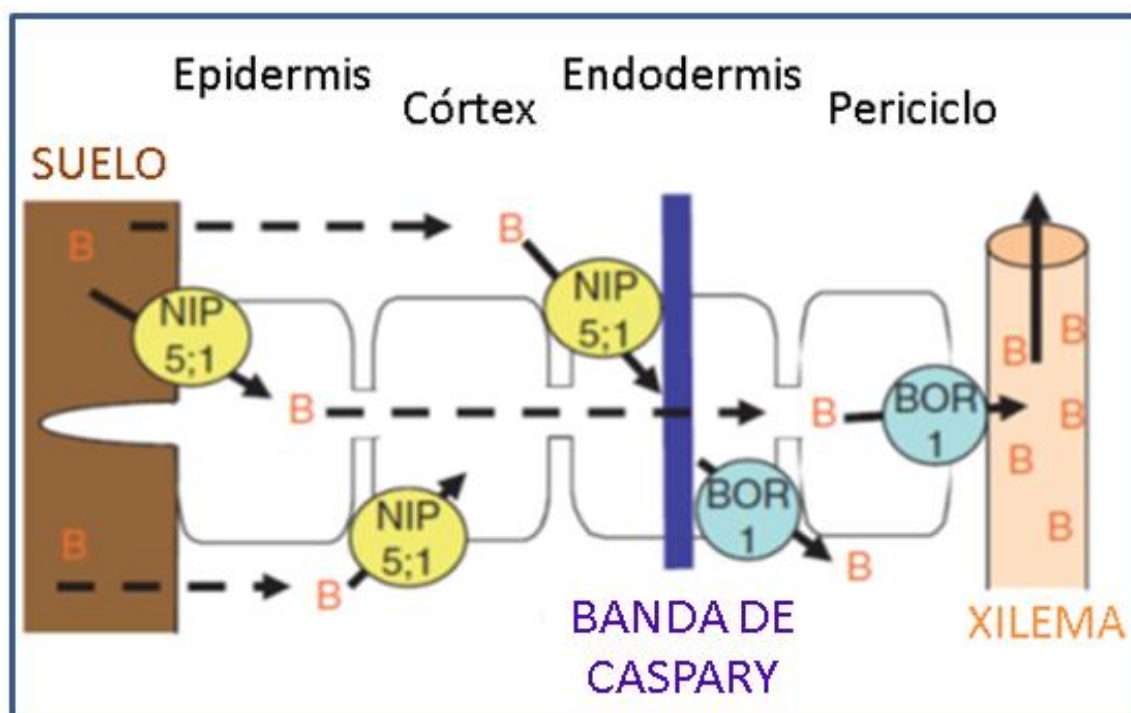


Figura 2. Modelo esquemático del transporte de B en la célula vegetal (modificado de Miwa y Fujiwara, 2010).

Una vez que el B está en el xilema, se transporta hacia el vástago gracias a la corriente de transpiración (Shelp et al., 1995). Además, puede ser transportado vía floema hasta los tejidos reproductivos y vegetativos (Shelp et al., 1995; Matoh y Ochiai, 2005), aunque se ha demostrado que su movilidad varía de unas especies a otras (Brown y Hu, 1996; Brown y Shelp, 1997). Por ejemplo, se ha sugerido que el B no puede ser movilizado en las plantas de tabaco desde los tejidos maduros hasta los órganos reproductivos y que, por tanto, el B en las estructuras reproductivas solo procedería de su incorporación a través de las raíces (Brown et al., 2002). No obstante, en las plantas de arroz ha sido demostrada la removilización de B desde los tejidos maduros hacia las hojas bandera (Bellaloui et al., 2003).

El transporte de este micronutriente por el floema se ha explicado mediante un mecanismo basado en la formación de complejos de B con carbohidratos que poseen grupos alcohol (manitol, sorbitol, galactitol y mio-inositol) (Brown y Hu, 1996; Hu y Brown, 1997; Eichert y Goldbach, 2010; Ruuhola et al., 2011). Sin embargo, el transporte de B por el floema, en especial hacia los tejidos jóvenes, también ocurre en

especies que no son capaces de producir ese tipo de carbohidratos, aunque el transporte no es tan eficiente (Shelp et al., 1998; Huang et al., 2001 y 2008; Stangoulis et al., 2001; Takano et al., 2001; Matoh y Ochiai, 2005).

Se ha demostrado en *A. thaliana* que *NIP6;1* —el gen más parecido a *NIP5;1*— es importante para el transporte desde el xilema hasta el floema en las regiones nodales del vástago con el fin de aportar B a las hojas jóvenes en crecimiento. *NIP6;1*, igual que *NIP5;1*, se sobreexpresa en condiciones de deficiencia de B (Tanaka et al., 2008).

I.1.4. Efectos de la deficiencia de boro en las plantas vasculares

La deficiencia de B afecta a la estructura y función de la pared celular como consecuencia del papel del B en la dimerización del RG-II y en el ensamblaje de las pectinas (O'Neill et al., 2004). Yu et al. (2002) demostraron que las pectinas de la pared celular (homogalacturonanos y RG-II) aumentaron bajo condiciones de deficiencia de B y que se inhibió su internalización.

Sin embargo, la deficiencia de B no solo tiene efectos sobre la estructura y funcionalidad de la pared celular, sino que causa muchos cambios fisiológicos y bioquímicos en las plantas vasculares, como la alteración de la función e integridad de la membrana plasmática, cambios en actividades enzimáticas y alteración en la producción de metabolitos (Goldbach, 1997), entre otros. Así, en los ápices de raíces de maíz, la deficiencia de B aumentó los niveles de actina y tubulina y alteró su patrón de polimerización en el citoesqueleto (Yu et al., 2003).

I.1.4.1. Efectos en el crecimiento reproductivo

El crecimiento reproductivo es más sensible a la deficiencia de B que el vegetativo (Dell y Huang, 1997). Esto podría deberse a una menor capacidad de distribución de este elemento a los tejidos reproductivos (Dell y Huang, 1997; Brown et al., 2002). Los típicos síntomas de la deficiencia de B en la etapa reproductiva son daños en las yemas, flores y frutos en desarrollo, alteraciones en la calidad de los frutos y en la viabilidad de las semillas (Marschner, 1995 y 2012).

Bajo condiciones de deficiencia de B, el polen está vacío, deformado y sin almidón (Dell y Huang, 1997). Se ha descrito que el crecimiento del tubo polínico también es sensible a la deficiencia de B (Rawson, 1996). En ausencia de B, los tubos polínicos se ven afectados como consecuencia de la función primaria del B en la estructura de la pared celular de los tubos polínicos (Brown et al., 2002). Además de la infertilidad masculina, la esterilidad del pistilo es otra alteración del sistema reproductivo causada por la deficiencia de B (Agarwala et al., 1981), a pesar de que los requerimientos de B son menores que en los órganos masculinos (Rerkasem et al., 1997).

Se ha descrito que las semillas aparentemente normales procedentes de plantas sometidas a deficiencia de B pueden tener alteradas sus propiedades fisiológicas y potencial de desarrollo (Dell y Huang, 1997).

I.1.4.2. Efectos en el crecimiento vegetativo

Se sabe que la deficiencia de B afecta a la elongación de la raíz (Dugger, 1983; Marschner, 1995; Martín-Rejano et al., 2011; Camacho-Cristóbal et al., 2015) y que el crecimiento de la raíz es más sensible a esta deficiencia que el tallo (Dell y Huang, 1997). El crecimiento de la raíz depende de dos procesos: la división celular (fundamentalmente en la región meristemática de la raíz) y el alargamiento celular (en la zona de elongación radical). Este efecto del B sobre el crecimiento radical sería una consecuencia directa de la pérdida de plasticidad de la pared celular, que es esencial en el proceso de expansión celular (Hu y Brown, 1994; De Cnodder et al., 2005), mientras que la inhibición de la división celular de la región meristemática de la raíz sería un efecto secundario (Dell y Huang, 1997). De hecho, uno de los primeros efectos que provoca la deficiencia de B (en tan solo 4 h) es la inhibición de la elongación radical. Este efecto parece estar mediado por las hormonas etileno y auxinas. Además, en esta reducción de la elongación radical también participaría la señalización a través de especies tóxicas de oxígeno (ROS) (Martín-Rejano et al., 2011; Camacho-Cristóbal et al., 2015).

Con respecto al tallo, la deficiencia de B afecta en primer lugar al ápice y las hojas en crecimiento. Las hojas maduras son más pequeñas, de un color verde oscuro, con una forma anómala y con pigmentación púrpura y puntos necróticos si la deficiencia es prolongada (Dell y Huang, 1997). Los tallos sometidos a deficiencia de B presentan más entrenudos y peciolo de mayor tamaño (Marschner, 1995).

Las relaciones hídricas de la planta dependen de la incorporación de agua por las raíces, el transporte de agua a través del sistema vascular y la pérdida de agua por la superficie de las hojas. La deficiencia de B puede causar malformaciones en los tejidos vasculares (Wimmer y Eichert, 2013), lo cual causaría un posible efecto sobre las relaciones hídricas. Además, el crecimiento de la raíz está severamente inhibido por la deficiencia de B, lo que reduce la superficie disponible para la incorporación de agua (Wimmer y Eichert, 2013).

I.1.4.3. Efectos en el metabolismo del nitrógeno

La deficiencia de B afecta al metabolismo del nitrógeno en las plantas vasculares. En las legumbres fijadoras de nitrógeno se ha demostrado que solo una pequeña proporción de los nódulos desarrollados son capaces de fijar nitrógeno bajo deficiencia de B (Bolaños et al., 1994). El desarrollo de los nódulos es altamente sensible a la deficiencia de B debido a que requieren un mayor aporte de este elemento que otros tejidos vegetales (Redondo-Nieto et al., 2003). Los síntomas de la deficiencia de B aparecen en los nódulos antes que en otros órganos que se pueden desarrollar usando el B almacenado en las semillas (Bolaños et al., 1994).

Por otra parte, una reducción en la absorción radical de nitrato, probablemente debida a una menor expresión de H^+ -ATPasa en la membrana plasmática, fue observada en las plantas de tabaco sometidas a deficiencia de B; además, esta deficiencia aumentó significativamente los niveles de asparragina y de la expresión del gen que codifica la asparragina sintetasa en las raíces de tabaco (Camacho-Cristóbal y González-Fontes, 2007; Beato et al., 2010). Por otro lado, la expresión de los genes de la glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa y las actividades aminantes y

desaminantes de esta última enzima incrementaron en las raíces de las plantas de tabaco sometidas a deficiencia de B durante 8 y 24 h (Beato et al., 2011 y 2014). Se ha propuesto que las enzimas asparagina sintetasa, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa tendrían una importante función en la aclimatación de las plantas de tabaco a la deficiencia de este micronutriente. La acción de estas enzimas impediría la acumulación de amonio en las raíces y mantendría la actividad del ciclo de Krebs (Beato et al., 2011 y 2014).

I.1.4.4. Efectos en la fotosíntesis

La deficiencia de B afecta a la fotosíntesis reduciendo la eficiencia del fotosistema II (Kastori et al., 1995; El-Shintinawy, 1999), aunque estos resultados se obtuvieron en experimentos realizados con largos períodos de deficiencia de B (10 días o más). Es más, en plántulas de cítricos, tanto el crecimiento como la fotosíntesis se redujeron en deficiencia de B. Además, las hojas de plántulas de naranja dulce sometidas a deficiencia de B tenían una menor actividad en enzimas fotosintéticas por la acumulación de hexosas, lo cual condujo a una reducción del crecimiento (Han et al., 2008). Otros autores también sugieren que el acúmulo de carbohidratos solubles en las hojas sometidas a deficiencia de B podría inhibir la fotosíntesis neta (Dugger, 1983; Dell y Huang, 1997). Sin embargo, Goldbach y Wimmer (2007) afirmaron que los mecanismos para una función primaria del B en la fotosíntesis son desconocidos y, por tanto, los efectos de la deficiencia de B en la fotosíntesis son secundarios.

I.1.4.5. Efectos en el estado redox

Un tratamiento de baja concentración de B en las células BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. "Bright Yellow 2") de tabaco causó una sobreexpresión de genes relacionados con el sistema de rescate frente al daño oxidativo (Kobayashi et al., 2004). Puesto que la deficiencia de B altera la estructura de la pared celular y también causa daño oxidativo, se puede concluir que ambos procesos están conectados (Kobayashi et al., 2004). Estos autores sugirieron que la deficiencia de B podría causar

un desequilibrio en el estado redox desencadenado por los daños en la estructura de la pared celular. Anteriormente, Cakmak y Römheld (1997) propusieron un posible papel del B como protector de la membrana plasmática frente al daño oxidativo causado por ROS. Además, el B estaría involucrado en la protección de la membrana tilacoidal a través de la reducción de los radicales libres de oxígeno (El-Shintinawy, 1999).

I.1.4.6. Efectos en el metabolismo secundario

El B está implicado en el metabolismo de los fenoles puesto que se ha observado una acumulación de estos compuestos bajo deficiencia de B (Dugger, 1983; Cakmak y Römheld, 1997; Blevins y Lukaszewski, 1998). Se ha demostrado que la concentración de fenilpropanoides y las actividades de las enzimas polifenol oxidasa y fenilalanina amonio-liasa incrementan en las hojas de tabaco durante tratamientos cortos de deficiencia de B (Camacho-Cristóbal et al., 2002). Además, análisis por HPLC-espectrometría de masas revelaron que los niveles de ácido clorogénico aumentan significativamente en las hojas de tabaco bajo deficiencia de B, y que también se acumulan dos amidas derivadas del ácido cafeico: *N*-cafeoilputrescina y dicafeoilespermidina (Camacho-Cristóbal et al., 2004).

Se ha descrito que el contenido de poliaminas solubles aumenta en las hojas de plantas de tabaco sometidas a deficiencia de B (Camacho-Cristóbal et al., 2005). Dado que las poliaminas están presentes en la pared celular asociadas con pectinas (D'Orazi y Bagni, 1987; Bouchereau et al., 1999) y que la deficiencia de B altera la estructura de la pared celular, el incremento de las poliaminas solubles podría ser una consecuencia de perturbaciones en las uniones de estas aminas con las pectinas de la pared celular (Camacho-Cristóbal et al., 2005). Esto se correlaciona con las alteraciones estructurales de las pectinas de la pared celular y el citoesqueleto observadas bajo deficiencia de B (Yu et al., 2002 y 2003).

I.1.4.7. Efectos en la expresión génica

Cada vez hay más datos que involucran al B en el control de la expresión de ciertos genes que son importantes para el metabolismo de las plantas (Camacho-Cristóbal et al., 2011), la diferenciación celular y la organogénesis (Reguera et al., 2009; Peng et al., 2012; Abreu et al., 2014).

Además, se ha descrito que la deficiencia de B produce cambios en los niveles de transcritos en procesos relacionados con el estrés oxidativo (Kobayashi et al., 2004), respuestas a heridas (Koshiba et al., 2010), incorporación de B y su translocación (Miwa y Fujiwara, 2010), pared celular y membranas (Camacho-Cristóbal et al., 2008; Camacho-Cristóbal et al., 2011) y asimilación del nitrógeno (Beato et al., 2010, 2011 y 2014).

I.1.5. Transmisión de la señal de deficiencia de boro

Aunque los efectos fisiológicos que provoca la deficiencia de este nutriente en las plantas son muy notables, se desconoce con precisión el mecanismo por el cual las plantas sienten y transmiten las señales de deficiencia de B hasta el núcleo. Los estudios sobre este campo son de interés creciente y se han hecho grandes avances en el conocimiento de las rutas de transducción de deficiencias de macronutrientes (Schachtman y Shin, 2007; Cui, 2012; Adams y Shin, 2014; Nath y Tuteja, 2015). Sin embargo, este conocimiento para la mayoría de los micronutrientes, especialmente el B, es muy limitado.

Se han propuesto diferentes hipótesis acerca de cómo la señal de deficiencia de B se transmite hasta el núcleo. Como se ha comentado, el B, tanto en su forma de ácido bórico como de anión borato, permite la estabilización de compuestos que contienen grupos diol en posición *cis* mediante la formación de complejos estables en las membranas y en las paredes celulares (Brown et al., 2002; Goldbach y Wimmer, 2007). Por tanto, se puede esperar que la deficiencia de B altere la estructura de la pared celular y dé lugar a una rápida reducción de su fuerza tensil. Este efecto podría desencadenar una cascada mecánica de señales a través del continuo pared celular-

membrana plasmática-citoesqueleto en el cual las proteínas de arabinogalactano tendrían, probablemente, el papel más importante (Goldbach y Wimmer, 2007). Esta posibilidad es consistente con las alteraciones estructurales de la pared celular y el citoesqueleto que ocurren en deficiencia de B (Yu et al., 2002 y 2003). Como se sabe, el continuo pared celular-membrana plasmática-citoesqueleto es la conexión funcional que se extiende desde la pared celular hasta el citoesqueleto a través de la cual las rutas de señalización pueden ser transmitidas, y que implican proteínas de la pared celular y la membrana plasmática.

También se ha propuesto que la deficiencia de B podría desencadenar la acumulación de ROS como consecuencia de los daños en la estructura de la pared celular (Kobayashi et al., 2004; Koshiba et al., 2010; Oiwa et al., 2013). Una reducción en la resistencia a la tracción de la pared celular podría provocar un estrés por tensión en la membrana plasmática, lo cual daría como resultado la inducción de la incorporación de calcio a través de canales y la producción de ROS por la enzima NAD(P)H oxidasa (Koshiba et al., 2010). De acuerdo con esto, una deficiencia severa de B provocaría la muerte celular específicamente en la zona de elongación de la raíz de las plantas de *arabidopsis*, probablemente causada por el daño oxidativo debido a la acumulación de ROS en esa región (Oiwa et al., 2013). Curiosamente, estos resultados son similares a los obtenidos en condiciones de deficiencia de calcio (Oiwa et al., 2013). La inmediata producción de ROS y la muerte celular en la zona de elongación de la raíz serían consecuencia de las deficiencias de B o calcio, y estarían relacionadas con un fallo en el entrecruzamiento de las pectinas sintetizadas *de novo* (Oiwa et al., 2013).

Otra hipótesis planteada es la participación de factores de transcripción en los mecanismos de respuesta a la deficiencia de B. En este sentido, los niveles de B intracelular podrían modular la interacción entre los factores de transcripción y los genes diana (González-Fontes et al., 2008). Esta interacción podría llevarse a cabo tanto por una combinación directa entre el borato/ácido bórico y el factor de transcripción o mediante la participación de alguna molécula capaz de unir estos compuestos de B al factor de transcripción. La naturaleza activadora o represora del factor de transcripción y su unión o no con borato/ácido bórico podrían regular la

expresión de los genes diana en un sentido u otro (González-Fontes et al., 2008). Así, es de destacar que la expresión génica del factor de transcripción WRKY6 se sobreexpresó en las plantas de arabidopsis procedentes de deficiencia de B (Kasajima et al., 2010).

No obstante, no se pueden excluir otros mecanismos implicados en la transmisión de la señal de deficiencia de B al núcleo. De hecho, las hipótesis descritas no pueden explicar satisfactoriamente cómo la deficiencia de B afecta a tantos procesos metabólicos y fisiológicos. En este proceso complejo de señalización no sería descartable que segundos mensajeros como el calcio y las proteínas relacionadas con él pudieran tener un papel fundamental como intermediarios en la ruta de transducción desencadenada por la deficiencia de B.

I.2. EL CALCIO

I.2.1. El calcio en las células vegetales

Las plantas están sometidas a un ambiente con cambios continuos y, para conseguir un desarrollo normal, necesitan mecanismos que sientan y procesen los factores ambientales como luz, temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes, etc. Es por ello que cuando las condiciones ambientales son desfavorables, se activan diferentes rutas de señalización para la aclimatación a dichas circunstancias (Xiong et al., 2002; Felle y Zimmermann, 2007; Mousavi et al., 2013).

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero fundamental para las plantas que participa en prácticamente todos los procesos regulatorios del desarrollo y en las respuestas a estreses (Rudd y Franklin-Tong, 1999; Sanders et al., 1999; Harper, 2001; Sanders et al., 2002; Dodd et al., 2010). Desde el punto de vista químico, el Ca^{2+} puede formar complejos fácilmente con proteínas, membranas y ácidos orgánicos (Grant et al., 1985; Dennison y Spalding, 2000; Batistic y Kudla, 2009).

En las plantas, la concentración de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) se mantiene en niveles de nanomolar (100-200 nM), mientras que en algunos orgánulos y

localizaciones celulares puede alcanzar concentraciones de milimolar, como la vacuola y el apoplasto (Kanchiswamy et al., 2014).

I.2.2. Cambios en la homeostasis de calcio

Existen múltiples factores bióticos y abióticos que provocan alteraciones en los patrones espacio-temporales de cambio en la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Estos patrones se conocen como firmas de calcio, en las cuales se codifica la información de cada estímulo en concreto (Sanders et al., 2002; Hetherington y Brownlee, 2004). Estas firmas de calcio están generadas por movimientos de Ca^{2+} finamente regulados –llevados a cabo a través de diferentes canales de Ca^{2+} , transportadores y bombas– entre el citosol (donde los niveles de Ca^{2+} se mantienen bajos) y diferentes compartimentos celulares con alta concentración de Ca^{2+} , como la vacuola, el retículo endoplásmico y el apoplasto (Sanders et al., 2002; Hetherington y Brownlee, 2004; Batistic et al., 2012). Por tanto, el balance entre la entrada de Ca^{2+} en el citosol y su salida hacia otros compartimentos celulares determina la duración e intensidad de los cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$. La salida de Ca^{2+} desde el citosol es un proceso que requiere un gasto energético, mientras que su entrada es pasiva desde un punto de vista termodinámico.

La entrada pasiva de Ca^{2+} en el citosol es un proceso mediado por diferentes canales, entre los que se encuentran los “cyclic nucleotide gated ion channels” o CNGC (Ma y Berkowitz, 2011). Los CNGC son canales no selectivos de cationes que se activan por la unión de nucleótidos cíclicos (AMPc o GMPc) y se inhiben por la unión competitiva de Ca^{2+} o calmodulinas con estos nucleótidos cíclicos (Ma y Berkowitz, 2011; Finka et al., 2012).

Los ACA (“autoinhibited Ca^{2+} -ATPases”) y CAX (“cation exchangers”) transportan Ca^{2+} desde el citosol hacia el apoplasto u orgánulos en contra de su gradiente de potencial electroquímico (Sanders et al., 2002; Dodd et al., 2010; Kudla et al., 2010). Los ACA son una clase de bombas de Ca^{2+} que transportan este catión fuera del citosol mediante la hidrólisis de ATP (Baxter et al., 2003). Se localizan en las membranas y se activan por la unión de calmodulinas, o proteínas similares a calmodulina, a un

dominio específico localizado en la zona N-terminal citosólica (Dodd et al., 2010). Los transportadores CAX utilizan el gradiente de pH generado por las bombas de protones –tales como H^+ -ATPasa y H^+ -pirofosfatasas– para exportar Ca^{2+} fuera del citosol (Pitman et al., 2011). Están principalmente localizados en el tonoplasto y su actividad está también modulada por proteínas reguladoras (Pittman et al., 2011).

Las firmas de calcio son percibidas, decodificadas y transmitidas mediante un extenso grupo de proteínas de unión a Ca^{2+} que funcionan como sensores de este (**Figura 3**). En las plantas se han identificado diversas proteínas sensoras de Ca^{2+} que participan en rutas de señalización asociadas a estreses abióticos, como las calmodulinas (CaM), las proteínas similares a calmodulina (CML), la quinasas dependientes de calcio (CPK) y las proteínas similares a calcineurina B (CBL) (Sanders et al., 2002; Hetherington y Brownlee, 2004; Hashimoto et al., 2011; Batistic et al., 2012). Las CaM y CML no presentan actividad enzimática, pero su unión a Ca^{2+} provoca cambios conformacionales que regulan la actividad de otras proteínas mediante interacciones de tipo proteína-proteína (Sanders et al., 2002). La unión con CaM y CML controla diferentes sistemas de canales y transporte de Ca^{2+} , así como quinasas y reguladores transcripcionales de las familias bZIP, WRKY y MYB (Popescu et al., 2007; Perochon et al., 2011; Batistic y Kudla, 2012). Las CPK combinan motivos de unión a Ca^{2+} similares a los de las CaM/CML, pero con un dominio quinasa que se activa tras la unión a Ca^{2+} . Las CPK regulan numerosos procesos metabólicos y fisiológicos como, por ejemplo, la respuesta estomática a ABA, el crecimiento del tubo polínico, el metabolismo del carbono y el nitrógeno o el transporte de calcio y potasio, entre otros (Zhu et al., 2007; Wu et al., 2010; Batistic y Kudla, 2012). A su vez, las CBL codifican las señales de calcio mediante su interacción con una familia de proteínas quinasas denominadas CIPK (“CBL interacting protein kinases”) (Batistic y Kudla, 2012).

En resumen, cuando el Ca^{2+} se une a estos sensores se producen cambios conformacionales que pueden tanto permitir su interacción con otras proteínas, como alterar su propia actividad enzimática. Estos ajustes en los sensores de Ca^{2+} transmiten la información contenida en esas firmas de calcio en forma de fosforilaciones, cambios en las interacciones proteína-proteína o mediante regulación transcripcional. De este

modo se inducen respuestas específicas frente a los estreses y se mejora la supervivencia de la planta bajo esas condiciones ambientales desfavorables (Perochon et al., 2011).

Igualmente, las proteínas de arabinogalactano (AGP) han sido propuestas como moléculas capaces de retener Ca^{2+} ; ante determinados estímulos el Ca^{2+} se liberaría de las AGP y, de este modo, se podría activar una cascada de señales dependiente de Ca^{2+} (Lampert y Várnai, 2013).

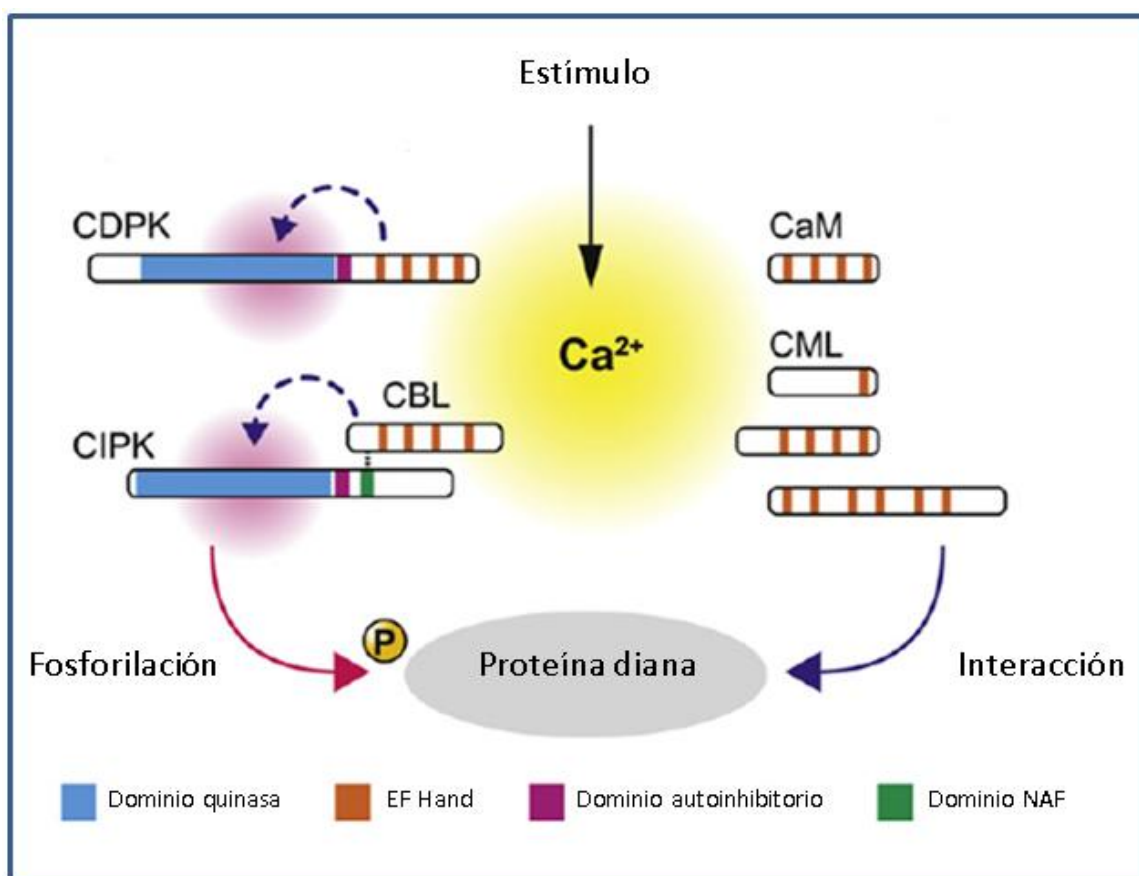


Figura 3. Clasificación de las proteínas sensoras de calcio (modificado de Hashimoto y Kudla, 2011).

I.2.2.1. Monitorización de los cambios en la homeostasis de calcio

El análisis de las firmas de calcio y la elucidación de la contribución de los diferentes reservorios para la señalización por Ca^{2+} requiere de herramientas que permitan monitorizar las dinámicas de Ca^{2+} con una alta resolución espacial y

temporal. Los “Yellow Cameleons” (YC) fueron desarrollados en el laboratorio de Roger Tsien a finales del siglo XX (Miyawaki et al., 1997) y están compuestos por un cromóforo donador (CFP), una calmodulina (CaM), un nexo de unión de glicilglicina, el péptido de unión a calmodulina de la quinasa de miosina de cadena ligera (M13) y un cromóforo aceptor (YFP). La unión de Ca^{2+} a la CaM inicia una interacción intramolecular entre CaM y M13 que cambia la forma de la proteína de una conformación extendida a una más compacta, resultando en un aumento en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre CFP y YFP (**Figuras 4 y 5**). Una reciente generación de Yellow Cameleons –YC3.6 (Krebs et al., 2012)– está provista del promotor UBIQUITIN 10, el cual se expresa de forma estable en *Arabidopsis thaliana*.

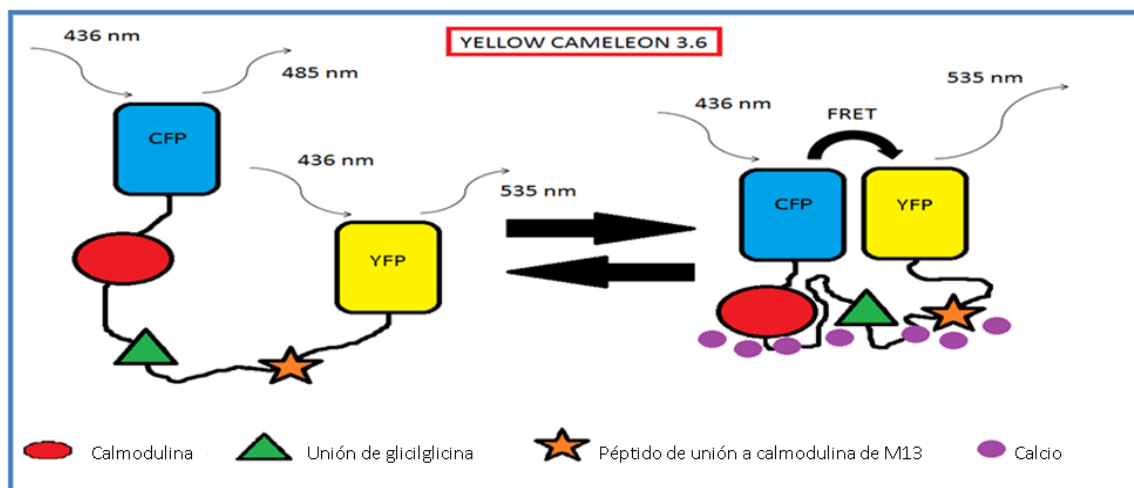


Figura 4. Esquema de la construcción YC3.6.

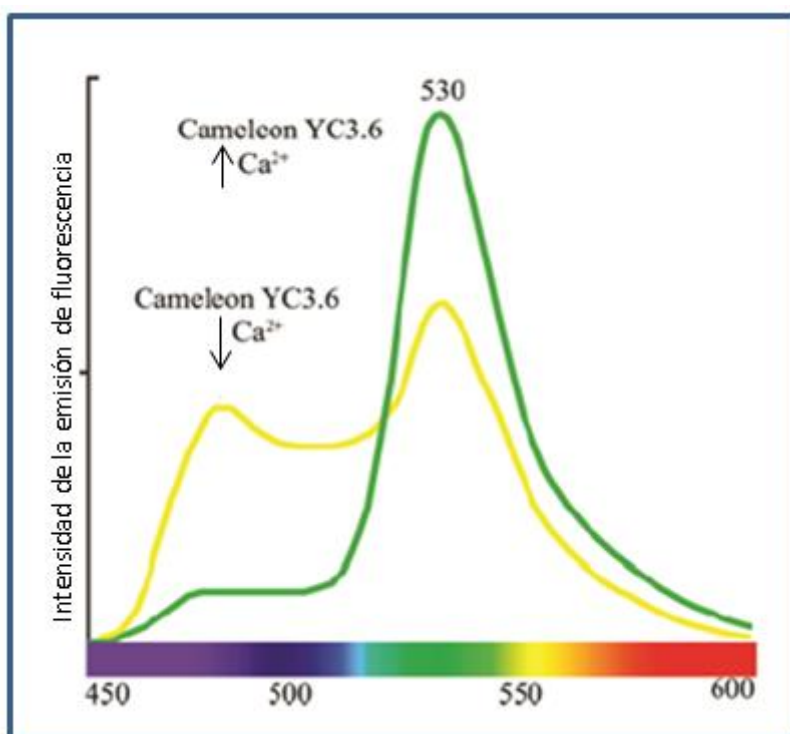


Figura 5. Efecto de los niveles de Ca^{2+} sobre la emisión de fluorescencia en YC3.6 (verde, alto nivel de Ca^{2+} ; amarillo, bajo nivel de Ca^{2+}) (modificado de Kanchiswamy et al., 2014).

La monitorización de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se realiza mediante un análisis de la razón entre la emisión de fluorescencia de YFP y CFP; en condiciones de alta concentración de Ca^{2+} , esta razón será mayor que 1, mientras que en aquellos casos en los que se den bajadas en la concentración Ca^{2+} , la razón será menor que 1 (**Figuras 4 y 5**). El resultado de estos análisis se transforma posteriormente en imágenes de falso color para determinar las variaciones espacio-temporales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$.

I.2.3. Interacción entre ácido abscísico, especies reactivas de oxígeno y calcio

La fitohormona ácido abscísico (ABA) tiene un papel fundamental en el control estomático y en la respuesta frente a diferentes estreses, en el que el Ca^{2+} es un componente esencial en la ruta de transducción de señales asociada a ABA. Así, se ha descrito en las raíces de maíz que el ABA puede activar los canales de Ca^{2+} a través de la hiperpolarización de las membranas (White et al., 2002). Además, las ROS funcionan como moléculas señalizadoras en muchos procesos biológicos. Las acciones de las ROS

están íntimamente relacionadas con la señalización por Ca^{2+} y se ha postulado que la activación de los canales de Ca^{2+} por ROS es un proceso fundamental para la señalización por ABA en las células guarda (Kwak et al., 2006). Así, AtrbohD y AtrbohF son dos NADPH oxidasas que mediante la producción de ROS regulan la hiperpolarización de canales permeables a Ca^{2+} localizados en la membrana. Esta activación de los canales de Ca^{2+} contribuye al incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en el cierre estomático inducido por ABA en arabidopsis (Kwak et al., 2003). Recientemente también se ha demostrado la existencia de este mecanismo de señalización de ABA en las raíces de arabidopsis (Jiao et al., 2013). Estos resultados indican que el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por ROS es un mecanismo importante en respuesta al ABA no solo en las células guarda, sino también en las raíces.

I.2.4. Agentes modificadores de la homeostasis de calcio: U73122 y EGTA

Las fosfolipasas C (PLC) están presentes en los eucariontes y catalizan la reacción por la cual el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) genera inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y 1,2-diacylglicerol (DAG); ambos productos actúan como segundos mensajeros en la ruta de transducción de señales dependiente de fosfoinosítido. Así, el IP_3 se une a su receptor presente en el retículo endoplásmico lo que provoca la liberación de Ca^{2+} (se sabe que también provoca la liberación de Ca^{2+} procedente de la vacuola). Por tanto, IP_3 actúa como nexo entre los receptores de la superficie celular y la concentración de Ca^{2+} intracelular en la señalización de funciones fisiológicas. Por su parte, el DAG permanece asociado a la membrana plasmática y activa la proteína quinasa C (Takekoshi et al., 1995).

El U73122 es un aminoesteroide que inhibe la actividad de las PLC y, por tanto, bloquea la liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3 desde el retículo endoplásmico y la vacuola (Andreeva et al., 2010). La utilización de este reactivo se emplea para el análisis de los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ asociados a diferentes estreses.

El EGTA es un agente quelante de Ca^{2+} ampliamente utilizado en los análisis de determinación de firmas de calcio.

I.2.5. Relación calcio-boro

La asociación de Ca^{2+} con B se ha observado en plantas, bacterias, animales y humanos, pero la naturaleza de esta interacción aún es debatida, siendo un área de interés creciente (Goldbach et al., 2001).

Se ha propuesto que el B tendría en común con el Ca^{2+} tres aspectos en la fisiología de las plantas vasculares, como son un papel estructural en la pared celular (pectato cálcico y boro-ramnogalacturonano II), una concentración citosólica muy baja y una posible función de señalización (González-Fontes et al., 2008). En esta relación, es curioso destacar que un adecuado aporte de B y Ca^{2+} reestablece el contenido de hierro en los nódulos de guisante sometidos a estrés salino (Bolaños et al., 2006). También se ha descrito que muchos de los efectos de la deficiencia de B sobre la formación de nódulos fijadores de nitrógeno de *Medicago truncatula* –principalmente durante la pre-infección, infección y los eventos de organogénesis de los nódulos– pueden ser parcialmente prevenidos mediante la adición de Ca^{2+} (Redondo-Nieto et al., 2003; Bolaños et al., 2004).

Otra propuesta interesante es que canales de Ca^{2+} mecanosensibles del plasmalema estarían implicados en la respuesta del déficit de B en las células BY-2 de tabaco (Koshiba et al., 2010). Así, la deficiencia de B rápidamente incrementó la expresión de genes de respuesta a estrés en las células BY-2. Esta inducción fue ampliamente suprimida por la ausencia de Ca^{2+} o por la adición de bloqueadores de la actividad de canales de Ca^{2+} (Koshiba et al., 2010).

Además, diversos estudios apoyan una posible interacción entre B y Ca^{2+} en la expresión génica (Kim, 2009; Yu et al., 2009; Camacho-Cristóbal et al., 2011; Batistic y Kudla, 2012; Redondo-Nieto et al., 2012; Quiles-Pando et al., 2013). Por tanto, la acción combinada de Ca^{2+} y B podría estar implicada en la regulación de diferentes procesos fisiológicos.

I.3. EL POTASIO

I.3.1. El potasio en las células vegetales

El potasio es uno de los nutrientes esenciales de las plantas. Es el catión más abundante en las células vegetales y participa en múltiples procesos fundamentales, como la activación enzimática, el transporte a través de la membrana y la osmorregulación, por todo lo cual afecta al desarrollo de las plantas (Clarkson y Hanson, 1980; Amtmann y Armengaud, 2009; Maathuis, 2009; Alemán et al., 2011).

La disponibilidad de potasio para las plantas es limitada, por lo que la mayoría sufren deficiencia de este nutriente en el medio natural. Para sobrevivir en estos ambientes las plantas han desarrollado una compleja red de señalización (Hodge, 2004; Ashley et al., 2006; Schachtman y Shin, 2007; Wang y Wu, 2010; Tsay et al., 2011). La señal de deficiencia de este elemento se inicia principalmente en las células de la raíz, donde es percibida en la membrana plasmática de las células de la epidermis y de los pelos radicales y, posteriormente, transmitida al núcleo. Posteriormente, las células llevan a cabo una serie de respuestas a corto y largo plazo (Schachtman y Shin, 2007). Las respuestas a corto plazo ocurren en horas e incluyen componentes como el potencial de membrana o fitohormonas (Maathuis y Sanders, 1993). Si la deficiencia de potasio se mantiene en el tiempo, se activan las respuestas a largo plazo, que implican cambios metabólicos (Armengaud et al., 2009) y morfológicos (Hodge, 2004).

Se sabe que diferentes deficiencias nutricionales, incluyendo potasio, nitrógeno, fósforo y azufre, inducen la producción de ROS en las células de las raíces de las plantas (Shin y Schachtman, 2004; Shin et al., 2005; Schachtman y Shin, 2007). En el caso de *arabidopsis*, la señal de ROS inducida por deficiencia de potasio se da en la región cercana a la zona de elongación y se puede detectar tras 6 horas de deficiencia (Shin y Schachtman, 2004; Shin et al., 2005). Se ha descrito la participación de la peroxidasa RCI3 en la generación de ROS en las raíces de *arabidopsis* sometidas a deficiencia de este catión (Kim et al., 2010).

I.3.2. El transporte de potasio en las plantas

La concentración de potasio citosólico en las células vegetales es relativamente estable y en torno a 100 mM, que es la concentración óptima para las enzimas citoplasmáticas. El potasio que se acumula en las vacuolas es el principal reservorio de este nutriente y su concentración oscila entre 10 y 200 mM dependiendo del tipo de tejido (Leigh y Wyn Jones, 1984; Walker et al., 1996).

En comparación con la alta concentración de potasio en las células vegetales, la concentración de potasio en los suelos es extremadamente baja y varía desde 0,1 a 1 mM. Por esta razón las células de la raíz absorben potasio en contra del gradiente de concentración (Schroeder et al., 1994; Maathuis et al., 2009).

La absorción de potasio por las raíces de las plantas vasculares se lleva a cabo por dos mecanismos distintos dependiendo de la concentración externa de potasio (Epstein et al., 1963; Nieves-Cordones et al., 2014; Shin, 2014). El mecanismo de alta afinidad está mediado principalmente por transportadores de potasio a una concentración externa por debajo de 0,2 mM, mientras que el mecanismo de baja afinidad se realiza mayoritariamente por canales de potasio a una concentración externa por encima de 0,3 mM. Parece ser que las células vegetales pueden percibir esta concentración externa y emplear los componentes apropiados para una determinada concentración (Epstein et al., 1963; Maathuis y Sanders, 1994; Alemán et al., 2011; Nieves-Cordones et al., 2014; Shin, 2014).

Los canales de potasio en las plantas vasculares están codificados por los genes de las familias Shaker, TPK (“tandem-pore K⁺”) y Kir (“K⁺ inward rectifier”) (Véry y Sentenac, 2003; Gambale y Uozumi, 2006; Lebaudy et al., 2007). A su vez, los transportadores de potasio pertenecen a varias familias de genes, entre los que se incluyen KUP/HAK/KT, HKT, NHX y CHX (Gierth y Mäser, 2007).

En *A. thaliana*, el canal AKT1 (familia “Shaker”) y el transportador HAK5 (familia KUP/HAK/KT) se expresan principalmente en las raíces y participan en la incorporación de potasio desde el exterior (Lagarde et al., 1996; Hirsch et al., 1998; Gierth et al., 2005). Ambos median casi todo el transporte de potasio en las raíces de arábidopsis

(Spalding et al., 1999; Gierth et al., 2005; Pyo et al., 2010). Se sabe que la actividad del canal AKT1 depende de su estado de fosforilación, que está controlado por la proteína quinasa CIPK23, la cual, a su vez, es activada por CBL1 y CBL9 (Li et al., 2006; Xu et al., 2006). Una vez que el potasio ha entrado en las células radicales se distribuye a otros órganos de la planta; así, su translocación desde las células del córtex de la raíz hasta el xilema está mediada por canales como SKOR (Wegner y Raschke, 1994; Gaymard et al., 1998), mientras que el transporte hacia el floema se realiza por el canal AKT2 (Marten et al., 1999; Lacombe et al., 2000; Gajdanowicz et al., 2011).

Los sensores de Ca^{2+} CBL1 y CBL9 están involucrados en la señalización para la incorporación de potasio en las raíces de arabis, especialmente en condiciones de deficiencia de este último (Li et al., 2006; Xu et al., 2006), lo cual sugiere que las células de la planta pueden requerir una señal de Ca^{2+} específica en la transmisión de la señal de deficiencia de potasio. Se ha descrito que en células guardas de arabis el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es una consecuencia de la baja concentración externa de potasio (Allen et al., 2001). En este incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ podrían participar los canales de Ca^{2+} activados por la hiperpolarización del potencial de membrana (Allen et al., 2001).

Existe una relación entre las ROS y la generación de la señal de Ca^{2+} en las células vegetales, ya que las NADPH oxidasas localizadas en la membrana plasmática producen ROS extracelulares que activan canales de Ca^{2+} localizados también en la membrana plasmática a través de los cuales entra Ca^{2+} hacia el citoplasma y participa en su señal (Pei et al., 2000; Demidchik et al., 2007).

* * * * *

Como se ha detallado anteriormente, pese a que la deficiencia de B provoca múltiples efectos en la fisiología y bioquímica de las plantas vasculares, se desconoce el mecanismo a través del cual las plantas son capaces de sentir y transmitir esta señal.

Recientemente se ha propuesto que el Ca^{2+} podría mediar en este proceso de señalización. Por tanto, los objetivos de esta investigación fueron determinar si hay una relación entre la deficiencia de B y la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, y si el Ca^{2+} participa en la transmisión de la señal de deficiencia de B en las raíces de *Arabidopsis thaliana*; también fue interesante determinar qué genes/proteínas participarían en esta señalización, así como estudiar la interacción con otros cationes, como el potasio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Este trabajo se llevó a cabo empleando como material vegetal las raíces de plantas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L., var. Columbia), tanto del genotipo silvestre (Col-0) como de diversos mutantes homocigóticos por inserción de T-DNA (**Tabla 1**) y de líneas reporteras. Las semillas fueron suministradas por The European Arabidopsis Stock Centre (NASC, <http://www.arabidopsis.info/>), si no se indica una procedencia distinta.

Tabla 1. Líneas de mutantes homocigóticos por inserción de T-DNA procedentes del NASC.

Mutante	Gen	Descripción del gen
N876594	AT3G17690	Canal iónico 19 regulado por nucleótidos cíclicos (<i>CNGC19</i>)
N654714	AT3G51860	Intercambiador 3 de cationes/H ⁺ (<i>CAX3</i>)
N815583	AT5G37770	Proteína 24 similar a calmodulina (<i>CML24</i>)
N668864	AT5G66210	Proteína quinasa 28 dependiente de calcio (<i>CPK28</i>)
N614657	AT1G76040	Proteína quinasa 29 dependiente de calcio (<i>CPK29</i>)
N665425	AT2G42380	Factor de transcripción bZIP34
N660266	AT3G23250	Factor de transcripción MYB15
N665334	AT3G60530	Factor de transcripción GATA4
N667392	AT2G46400	Factor de transcripción WRKY46

Las semillas de la línea reportera que expresa de forma estable la construcción Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6) UbiQ10::YC3.6-bar#22-2 (línea Col0::YC3.6; Krebs et al., 2012), de la línea homocigótica insercional para los genes *CBL1*, *CBL4*, *CBL5* y *CBL9* (línea *cbl1/4/5/9*) y de la línea homocigótica insercional para esos genes que expresa de forma estable la construcción YC3.6 (línea *cbl1/4/5/9::YC3.6*) fueron cedidas por el Dr. Jörg Kudla (Universität Münster, Alemania).

Las semillas de las líneas reporteras GUS pCML12::GUS y pCML24::GUS procedieron de la Dra. Janet Braam (Rice University, EE.UU.).

La Dra. Tina Romeis proporcionó las semillas de la línea reportera pCPK28::GUS (Freie Universität Berlin, Alemania).

Las semillas de la línea reportera pACA10::GUS y de la línea homocigótica insercional para el gen *ACA10* (línea *aca10*) fueron suministradas por el Dr. Robert Sharrock (Montana State University, EE.UU.).

Las semillas de la línea reportera pMYB15::GUS fueron aportadas por el Dr. Daowen Wang (Chinese Academy of Sciences, R. P. China).

Los cultivos detallados a continuación se llevaron a cabo en el interior de una cámara de ambiente controlado (Radiber, España) con un régimen de luz/oscuridad 16/8 h, de temperatura 25/22 °C, de humedad relativa 75 % y bajo una intensidad lumínica de 120-150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa.

Las semillas de arabidopsis se esterilizaron con hipoclorito sódico al 5 % (v/v) durante 10 minutos en agitación y, a continuación, se lavaron con agua estéril de alta pureza. Posteriormente se trataron dos veces con etanol absoluto y, finalmente, se lavaron 6 veces con agua estéril de alta pureza. Una vez esterilizadas, las semillas se sembraron individualmente en placas de Petri cuadradas (12 cm x 12 cm, Greiner Bio-One, EE.UU.) que contenían 50 mL de un medio de cultivo sólido estéril (**Tabla 2**); esta última operación se realizó en una campana de flujo laminar.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo sólido estéril empleado para el cultivo de plantas de arabidopsis.

Compuesto	Concentración en el medio
KNO ₃	3 mM
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 mM
KH ₂ PO ₄	0,75 mM
FeNa-EDTA	12,5 μM
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	2,5 μM
ZnSO ₄ · H ₂ O	0,5 μM
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,25 μM
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,125 μM
NaCl	12,5 μM
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,05 μM
H ₃ BO ₃	2 μM
Sacarosa	0,5 % (p/v)

El medio de cultivo se tamponó con MES al 0,05 % (p/v) y el pH se ajustó a 5,7 con KOH. Para la gelificación del medio se utilizó Phytigel al 1 % (p/v). Las placas de Petri con las semillas de *arabidopsis* se mantuvieron a 4 °C en oscuridad en un frigorífico durante 2 días, o 5 en los experimentos de análisis morfológico de las raíces, para homogeneizar su germinación; pasado este tiempo, las placas se colocaron verticalmente en la cámara de cultivo de plantas.

Tras 5, 6 o 7 días en estas condiciones, las plántulas se transfirieron con ayuda de unas pinzas a otras placas (tiempo 0 h) que contenían la misma solución nutritiva descrita en la **Tabla 2**, en ausencia o no (2 µM) de H₃BO₃. A las 6 y/o 24 horas desde el inicio de los tratamientos se realizaron los diferentes análisis.

II.2. RECOGIDA Y PROCESADO DEL MATERIAL VEGETAL

Una vez finalizado el tiempo de los distintos tratamientos, las muestras de material vegetal se recogieron del siguiente modo: con la ayuda de un bisturí se separaron los vástagos –los cuales se desecharon– de las raíces, estas se secaron con toallas de papel, se introdujeron en viales independientes que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y, finalmente, se almacenaron a -80 °C.

Para el procesado del material vegetal previamente recogido y congelado, las muestras se trituraron con dos pequeñas bolas de acero inoxidable en cada uno de los viales, los cuales se colocaron en un molino vibratorio (Retsch, Alemania). La trituración se llevó a cabo dentro de unas cajas de aislamiento térmico, previamente sumergidas en nitrógeno líquido para mantener las muestras congeladas; la pulverización se realizó en dos ciclos de 30 segundos con una frecuencia de 30 vibraciones por segundo. Estas muestras trituradas se almacenaron a -80 °C hasta el momento de los análisis.

II.3. EXTRACCIÓN Y MANIPULACIÓN DE RNA

Debido a la gran facilidad con la que el RNA se degrada, para su extracción y manipulación se trabajó con mucha limpieza, utilizando guantes, material esterilizado

y soluciones tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1 % (v/v), un inhibidor de RNAasa. Las cubetas de electroforesis empleadas para el fraccionamiento del RNA total fueron pretratadas con una solución de SDS 1 % (p/v) y NaOH 0,1 M.

Para llevar a cabo la extracción del RNA total de las muestras previamente trituradas se empleó el método Tri-Reagent (Molecular Research Center, EE.UU.). El material triturado (100 mg) se homogeneizó con 1 mL del reactivo Tri-Reagent y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron a cada vial 200 μ L de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico [24/1 (v/v)], se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación los viales se centrifugaron a 12.500 *g* durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante acuoso que contenía el RNA se transvasó a nuevos viales de 1,5 mL a los que se añadieron 500 μ L de isopropanol para conseguir su precipitación. Estos viales se incubaron a -20 °C durante 2-3 horas y se centrifugaron a 12.500 *g* durante 20 minutos a 4 °C. Pasado ese tiempo se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado, que contenía el RNA, con 1 mL de etanol al 75 % (v/v). Los viales se centrifugaron nuevamente a 12.500 *g* durante 20 minutos a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió el RNA en 87,5 μ L de agua de alta pureza tratada con DEPC.

La determinación de la calidad del RNA total extraído se llevó a cabo como se detalla a continuación. Se mezcló 1 μ L de solución de RNA con 4 μ L de agua tratada con DEPC y con 5 μ L de una solución desnaturalizante que contenía: formamida desionizada al 76,2 % (v/v), formaldehído al 2,8 % (v/v), tampón MOPS 0,76x (pH 7,0), azul de bromofenol al 0,02 % (p/v), Na₂-EDTA 76 μ M, glicerol al 3,8 % (v/v) y bromuro de etidio (10 μ g/mL). El RNA se desnaturalizó por calentamiento a 70 °C durante 5 minutos; pasado ese tiempo las muestras se colocaron en hielo durante 5 minutos. A continuación se realizó el fraccionamiento del RNA total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) en tampón TAE 1x [Tris-acetato 40 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM]. Finalmente se visualizó el RNA fraccionado mediante la exposición de los geles a luz ultravioleta en un transiluminador Bio-Rad Gel Doc 2000 (EE.UU.).

Una vez que se comprobó que el RNA extraído no estaba degradado, se procedió a digerir el posible DNA genómico contaminante. Para ello, las muestras de RNA se trataron con 6,75 unidades (U) de DNAasa I (Qiagen, Alemania) en un volumen final de 100 μ L durante 30 minutos a 25 °C. Transcurrido ese tiempo las muestras se purificaron mediante columnas RNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se eluyó con 18 μ L de agua libre de RNAasa.

Posteriormente, la eficiencia del tratamiento con DNAasa I se comprobó por PCR, es decir, que las muestras de RNA estaban totalmente libres de DNA genómico. Se utilizó 1 μ L de cada solución de RNA en un volumen final de 50 μ L que contenía: $MgCl_2$ 2 mM, dNTP 0,2 mM, tampón de la enzima Taq DNA polimerasa (Biotaq) 1x, cebadores L y R del gen *CLATRINA* (AT4G24550) 0,2 μ M y 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa. Se utilizó el siguiente programa para llevar a cabo la amplificación por PCR:

- 94 °C durante 5 minutos
 - 94 °C durante 30 segundos
 - 60 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 1 minuto
 - 72 °C durante 5 minutos
 - 4 °C durante 5 minutos
- } 40 veces

La secuencia de los cebadores L y R empleados para el gen *CLATRINA* fueron:
L: AGCATACACTGCGTGCAAAG y R: TCGCCTGTGTACATATCTC.

En aquellas muestras en las que se observó la presencia de contaminación con DNA genómico, se repitió el tratamiento con DNAasa I, la purificación con columnas y la comprobación por PCR hasta que no se detectó contaminación.

Finalmente, se determinó por espectrofotometría la calidad y cantidad del RNA total extraído; para ello, se midió la absorbancia de cada muestra a 260 y 280 nm en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.). Se asumió que la calidad de las muestras de RNA era buena cuando el cociente entre las absorbancias a 260 nm y 280

nm tuvo un valor comprendido entre 1,8 y 2. Para determinar la concentración de RNA de cada muestra se tuvo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de RNA de 40 µg/mL.

II.4. ANÁLISIS POR MICROARRAYS

Se tomaron 10 µg de RNA aislado de las raíces y se les añadió agua de alta pureza tratada con DEPC hasta un volumen de 180 µL. A continuación, se añadieron 20 µL de acetato sódico 3 M pH 5,2 y se homogeneizaron. Finalmente, se añadió etanol absoluto a cada muestra en una proporción 2:1 (v/v) para precipitar el RNA. Estas muestras fueron analizadas en el Centro Nacional de Biotecnología (Madrid), donde se utilizó 1 µg del RNA total para llevar a cabo las hibridaciones con los microarrays de arabidopsis obtenidos por David Galbraith (Universidad de Arizona, EE.UU.).

Se empleó el software LIMMA (Smyth y Speed 2003; Smyth, 2004) para llevar a cabo la corrección de ruido de fondo y la normalización de los datos de expresión.

Para determinar los niveles de expresión diferencial, se empleó el cociente entre la señal de las muestras procedentes de deficiencia de boro y la señal de las muestras procedentes de suficiencia. Se calculó el *p*-valor del estadístico de Bayes (Smyth, 2004) para confirmar que las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas.

II.5. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)

La síntesis de cDNA a partir de las muestras de RNA total se llevó a cabo en dos reacciones:

1) Unión del oligo dT de 18 pares de bases (dT18) a la cola poliA del mRNA. Para ello, se tomaron 2 µg de RNA de cada muestra y se le añadieron dTT18 1 µM y agua de alta pureza tratada con DEPC hasta un volumen final de 13 µL. Las muestras se colocaron en un termociclador a 72 °C durante 5 minutos; posteriormente se bajó la temperatura hasta 12 °C durante 2 minutos a razón de 1 °C cada 10 segundos. Finalmente se colocaron las muestras en hielo durante 10 minutos.

2) Retrotranscripción del cDNA a partir de las moléculas de mRNA. Al volumen resultante de la primera reacción se le añadieron, hasta un volumen final de 20 μ L, tampón de la enzima retrotranscriptasa 1x, dNTP 1 mM y 50 U de la enzima retrotranscriptasa M-MuLV (New England Biolabs, EE.UU.) por microgramo de RNA total empleado. Esta mezcla se incubó a 42 °C durante 90 minutos; pasado ese tiempo, la reacción se detuvo añadiendo a cada vial 180 μ L de una solución que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8) y Na₂-EDTA 1 mM. El cDNA sintetizado se almacenó a -20 °C.

Para comprobar que el cDNA se había obtenido correctamente se realizó una PCR. Se pusieron 5 μ L del cDNA diluido 5 veces en un volumen final de 50 μ L que contenía MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, tampón de la enzima Taq DNA polimerasa (Biotaq) 1x, cebadores L y R del gen *CLATRINA* 0,2 μ M y 1 U de la enzima Taq DNA polimerasa. Se utilizó el siguiente programa para llevar a cabo la amplificación por PCR:

- 94 °C durante 5 minutos
 - 94 °C durante 30 segundos
 - 60 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 1 minuto
 - 72 °C durante 5 minutos
 - 4 °C durante 5 minutos
- } 40 veces

Para visualizar los productos de la amplificación se procedió como sigue. A cada vial (volumen final 50 μ L) se le añadieron 6 μ L del tampón de carga 6x que contenía: glicerol al 30 % (v/v), xilencianol al 0,25 % (p/v) y azul de bromofenol al 0,25 % (p/v). A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (p/v) en tampón TAE 1x (70 V, 20-30 minutos). Finalmente se visualizó el resultado de la amplificación mediante la exposición de los geles a luz ultravioleta en un transiluminador Bio-Rad Gel Doc 2000 (EE.UU.). El diseño de los cebadores empleados en la PCR correspondieron a secuencias de dos exones distintos del extremo 3' del gen *CLATRINA*, lo cual permitió determinar la eficiencia de la síntesis de cDNA y la ausencia de contaminación con DNA genómico. El producto de la PCR que utilizó el cDNA como molde fue de tamaño inferior (196 pb) al obtenido a partir de DNA genómico (355 pb).

El cDNA sintetizado a partir del RNA total aislado de las muestras de raíces de plantas de arabidopsis se utilizó para analizar la expresión de diversos genes. Para ello se empleó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR).

II.5.1. Diseño de cebadores

Todos los cebadores empleados en este trabajo se diseñaron con el programa Primer3. Los criterios empleados en el diseño fueron:

- El tamaño del producto de amplificación debía estar comprendido entre 70 y 200 pb, siempre que fuera posible.
- Las últimas 5 pb del extremo 5' de cada cebador no debían contener más de dos bases G o C.
- Cada pareja de cebadores debía tener una T_m de 60 ± 1 °C.
- Cada cebador debía tener un tamaño aproximado de 20 nucleótidos.

Las secuencias correspondientes a los genes de arabidopsis se obtuvieron de la página web www.arabidopsis.org.

II.6. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (Q-RT-PCR)

El cDNA previamente obtenido se diluyó 5 veces con agua estéril de alta pureza. Los análisis de expresión se realizaron en un instrumento para PCR cuantitativa a tiempo real (Bio-Rad, modelo MyIQ), en un volumen final de 25 μ L, a partir de 5 μ L de solución de cDNA diluido y utilizando el kit SensiMix SYBR & Fluorescein (Bioline, Reino Unido).

Se llevó a cabo de forma independiente una recta de calibrado para el gen de referencia *TON1A* (AT3G55000) y para el gen cuya expresión se quiso analizar. Para ello se utilizaron diluciones seriadas (1/2, 1/4 y 1/8) de una de las muestras control recogidas a tiempo 0 h. Los resultados obtenidos fueron referidos a ese patrón interno.

El programa empleado para la Q-RT-PCR fue el siguiente:

- 95 °C durante 10 minutos
 - 95 °C durante 15 segundos
 - 60 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 10 segundos
 - 95 °C durante 1 minuto
 - 73 °C durante 30 segundos
- } 40 veces

Se realizaron curvas de punto de fusión con el fin de comprobar que en las Q-RT-PCR se obtuvo un único producto de amplificación, para lo cual las muestras se sometieron a un incremento de temperatura desde 73 °C hasta 95 °C a una velocidad de $0,05\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software MyIQ Single-Color (Bio-Rad, EE.UU.).

Los cebadores que se emplearon para llevar a cabo las Q-RT-PCR se recogen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cebadores de los genes de arabidopsis analizados por Q-RT-PCR.

Gen	Descripción del gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tamaño del producto de amplificación (pb)
AT3G55000	Proteína involucrada en la organización de los microtúbulos (<i>TON1A</i>)	L: CATGGGAAAAGCTAGAGGTGGAA R: CAACGGTTAATTTGAAATTGTCGG	234
AT1G27770	Calcio-ATPasa 1 tipo P _{IIb} de membrana plasmática (<i>ACA1</i>)	L: CGGCCTTTGGAAGTTTGATA R: GAAGCAAATGCTCCTCCAAA	108
AT4G29900	Calcio-ATPasa 10 tipo P _{IIb} de membrana plasmática (<i>ACA10</i>)	L: AAACCGGTGGAGAAGGAACT R: CCACTAAAAGCCACCTTTGG	163
AT3G63380	Calcio-ATPasa 12 tipo P _{IIb} de membrana plasmática (<i>ACA12</i>)	L: AGCACTTGCATCCCTTTCAT R: TCCAGCCATCCGTAGAGAAC	181
AT3G22910	Calcio-ATPasa 13 tipo P _{IIb} de membrana plasmática (<i>ACA13</i>)	L: ACATTATGAAGCATTGATTTGTTTT R: AAACGCTGTTCAATGAAAATGA	85
AT3G17690	Canal iónico 19 regulado por nucleótidos cíclicos (<i>CNGC19</i>)	L: CCAAGTGGCTTGGAGATACC R: TCTACCAAACCAACATCATCATC	101
AT3G51860	Intercambiador 3 de cationes/H ⁺ (<i>CAX3</i>)	L: TGATTCGTCATCCAAAAACG R: AAGCTCCCTCCCTCATTCTAT	70
AT2G41100	Proteína 12 similar a calmodulina (<i>CML12</i>)	L: TTATGCCAATAGGGTCTGACAA R: TGCACACAACCTGAAGATGGTAA	125
AT5G37770	Proteína 24 similar a calmodulina (<i>CML24</i>)	L: GAAGATTTGCGCGGAGATTAG R: GGTTTTTAATCGCCGTCCT	81
AT5G39670	Proteína 45 similar a calmodulina (<i>CML45</i>)	L: TGTTGTCTCCGCACCTTGTA R: CCAAACTCATTGGTTTTTACGC	81
AT3G47480	Proteína 47 similar a calmodulina (<i>CML47</i>)	L: TGATGAGAATCAGGATGGGTTT R: CCTTAACCATCTTCTACACTCCA	107
AT5G66210	Proteína quinasa 28 dependiente de calcio (<i>CPK28</i>)	L: CGCAGCAAAAACAAAGAGAGA R: CTTTTGGTGCCCAACCATTA	151
AT1G76040	Proteína quinasa 29 dependiente de calcio (<i>CPK29</i>)	L: TGACGAATGCTTTTGCTTCA R: TGGGCCATAAGTTTCATTTTATTT	170

AT4G17615	Proteína 1 similar a calcineurina B (<i>CBL1</i>)	L: CTGAAAAATGCCAAATGAAATG R: CCTCCGAATGGAAGACAAAA	95
AT4G01420	Proteína 3 similar a calcineurina B (<i>CBL3</i>)	L: TCAGGCATCCTTCCCTTCTA R: TGGAAGTTGCATTGCCTAAA	96
AT5G24270	Proteína 4 similar a calcineurina B (<i>CBL4</i>)	L: GCAAAAACGACGGAAAAATC R: TTGATGAGCGATGGATTCAA	70
AT5G47100	Proteína 9 similar a calcineurina B (<i>CBL9</i>)	L: AGACCAAGTCGTAGGCTGGA R: GAGAGCCAAAAGTAATCGCAATA	140
AT4G33000	Proteína 10 similar a calcineurina B (<i>CBL10</i>)	L: TTGGACTTGTTAGGTGCAACA R: GGTCAGAAAGTTCATCGGATAGC	79
AT1G30270	Proteína quinasa de interacción con CBL (<i>CIPK23</i>)	L: AAACCCGAGCTTGTCAAATG R: CCATCGGTTCTTCCTCTTT	162
AT5G65020	Anexina 2 de unión a calcio (<i>ATANN2</i>)	L: CAACTTTCGAGTTCCTCCTTC R: TGCAGAACCAGTTTCACAACTC	73
AT5G54490	Proteína 1 de unión a pinoid (<i>PBP1</i>)	L: CCGGCATTGATAGAGAAACC R: TTTTGGTTTTGTGTAAACAATTCA	70
AT2G42380	Factor de transcripción bZIP34	L: CCATCATGCATCATCATCAAC R: CTTCCATCAACCCCAAGAAA	200
AT3G58120	Factor de transcripción bZIP61	L: TCATGGCGAAAAGATTCTTGA R: CCCCTCCCACTCCATAAGA	164
AT2G31180	Factor de transcripción MYB14	L: TGACATGGAGTTTTGGTTTGA R: AACTCGGGTATGTCGGAAAA	72
AT3G23250	Factor de transcripción MYB15	L: GGAGTAAAGTGAAATGGTGCAA R: TTTTGAAAACGCAGCCTCTAA	131
AT3G60530	Factor de transcripción GATA4	L: TGCACGTTCTCATCTTCGTC R: TCACTGGGAACGCAGAGAT	70
AT2G46400	Factor de transcripción WRKY46	L: TGCCGATGGATAAAAAATTGG R: CCCTGCTGAAAAACAATGAAA	74
AT2G47160	Transportador de boro (<i>BOR1</i>)	L: AATCTCGCAGCGGAAACG R: TGGAGTCGAACTTGAACCTGTC	141
AT4G10380	Canal de ácido bórico (<i>NIP5;1</i>)	L: TGATGCGAACTTGTCTCGTC R: AGCCTCGTCTCCGAGGTAAC	114
AT2G26650	Canal de potasio (<i>AKT1</i>)	L: TGAAGGCAGAACTGGAAACC R: AGTACCAGCTTCCCGGCTAT	78

AT4G13420	Transportador de potasio (<i>HAK5</i>)	L: TGGGAGAGACCGAGATTACG R: TGTCTCCTTCCCGACAATTC	105
AT3G02850	Canal de potasio (<i>SKOR</i>)	L: CTGTGGGTACCTCGAAGCAT R: ACAAGAAGCCTCCGGAACAT	75

II.7. OBTENCIÓN DE MUTANTES HOMOCIGÓTICOS INSERCIONALES

Para confirmar que las semillas suministradas por The European Arabidopsis Stock Centre se correspondían con líneas homocigóticas insercionales, se procedió de la siguiente forma. Se sembraron 40 semillas de cada mutante de forma individual en un semillero; de aquellas que germinaron, y tras 2-3 semanas de crecimiento, se recogieron aproximadamente 100 mg de hojas en viales estériles de 2 mL y se llevó a cabo una extracción de DNA genómico. El material recogido se trituró manualmente con arena de mar lavada de grano fino (Panreac, España) y 250 µL de una solución de extracción que contenía: CTAB al 2 % (p/v), Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 20 mM (pH 8,0) y NaCl 110 mM. Tras la trituración, se añadieron otros 250 µL de solución de extracción y los viales se incubaron a 65 °C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se les añadieron 500 µL de cloroformo/alcohol isoamílico [24/1 (v/v)] y se centrifugaron durante 10 minutos a 12.500 g. Se recuperó la fase acuosa y se transvasó a viales estériles de 1,5 mL. A continuación se añadieron 500 µL de isopropanol y las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 12.500 g. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol al 75 % (v/v). Tras una última centrifugación de 10 minutos a 12.500 g se desechó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado, que se resuspendió con 100 µl de agua estéril de alta pureza.

Para cada mutante analizado se diseñó una pareja de cebadores L y R utilizando el programa Primer3 (ver **apartado II.5.1**); los cebadores se encontraban flanqueando el punto de inserción del T-DNA (**Tabla 4**). Se realizó una primera PCR (programa descrito en el **apartado II.3**) con la correspondiente pareja de cebadores usando como molde el DNA genómico extraído previamente; aquellos que presentaron producto de amplificación fueron descartados. Con el resto de los mutantes se realizaron otras dos

PCR: (i) con el cebador L y otro que hibridaba con la secuencia del T-DNA (LbB1 para mutantes SALK o LB3 para mutantes SAIL), y (ii) con el cebador R y el LbB1 o LB3 según el tipo de mutante. Aquellos que presentaron amplificación con la pareja L-LbB1/LB3 y/o R-LbB1/LB3 fueron seleccionados como mutantes homocigóticos insercionales. Los cebadores empleados se recogen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cebadores empleados para la determinación de mutantes homocigóticos insercionales.

Gen	Descripción del gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tamaño del producto de amplificación (pb)
T-DNA	<i>LbB1</i>	L: GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
T-DNA	<i>LB3</i>	L: TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATC	
AT3G17690	Canal iónico 19 regulado por nucleótidos cíclicos (<i>CNGC19</i>)	L: TGCACGTGGCATTGATTT R: AAGGAGTAGCACGGTGTTC	238
AT3G51860	Intercambiador 3 de cationes/H ⁺ (<i>CAX3</i>)	L: ACCGGGAAACATGGATACAA R: ATGCATCCTGACCAACATGA	677
AT5G37770	Proteína 24 similar a calmodulina (<i>CML24</i>)	L: GAAGATTTGCGCGGAGATTAG R: TCGAGGAGTCACAAGAAATGG	486
AT5G66210	Proteína quinasa 28 dependiente de calcio (<i>CPK28</i>)	L: GGTGATGATGCGACCATAGA R: TTGATTCATCATACTTACGCAATTC	297
AT1G76040	Proteína quinasa 29 dependiente de calcio (<i>CPK29</i>)	L: GGTGATGATGCGACCATAGA R: TTGATTCATCATACTTACGCAATTC	388
AT2G42380	Factor de transcripción bZIP34	L: CGAATCGCTGCTTTATCTCA R: TGAGGAGCTGCTCTGTTTCA	400
AT3G23250	Factor de transcripción MYB15	L: CGGAGCTAGCAGATTCATCA R: CGATATCCGCACCAAAAGTT	195
AT3G60530	Factor de transcripción GATA4	L: TGCACGTTCTCATCTTCGTC R: TTCGTCGTTGGAGAAATCG	200
AT2G46400	Factor de transcripción WRKY46	L: AACATCACATCCCCGAAGAC R: CGGTTTCATGTCTTCCGATT	111

II.8. OBTENCIÓN MEDIANTE CRUCES GENÉTICOS DE MUTANTES HOMOCIGÓTICOS INSERCIONALES QUE CONTIENEN LA CONSTRUCCIÓN YC3.6

La obtención de líneas homocigóticas insercionales con la construcción YC3.6 se realizó de la siguiente forma: se sembraron de forma independiente semillas de la línea Col::YC3.6 y de cada una de las líneas homocigóticas insercionales (**Tabla 1**), y se llevó a cabo un cruzamiento artificial entre los genotipos. Para ello, se liberaron los pistilos de las flores de las líneas homocigóticas insercionales antes de que tuviera lugar su autopolinización (yema floral cerrada), y se depositó sobre estos el polen procedente de una flor de la línea Col0::YC3.6 para conseguir así el cruce entre ambos parentales.

Las semillas F_1 obtenidas en esos cruces se sembraron y de las que germinaron se recogieron muestras de hojas para llevar a cabo una extracción de DNA genómico como se describe en el **apartado II.7**. Posteriormente, se realizaron cuatro PCR (programa descrito en el **apartado II.3**) usando como molde el DNA extraído: (i) con la pareja de cebadores L-R que flanquean el sitio de inserción del T-DNA en el mutante homocigótico insercional (**Tabla 4**), (ii) con el cebador L y otro que hibridaba con la secuencia del T-DNA (LbB1 para mutantes SALK o LB3 para mutantes SAIL), (iii) con el cebador R y otro que hibridaba con la secuencia del T-DNA (LbB1 para mutantes SALK o LB3 para mutantes SAIL), y (iv) con la pareja de cebadores YC3.6L (AGGAACTTGGCACCGTTATG) y YC3.6R (CCCCTTGCTGTCATCATTT) los cuales hibridaban con la secuencia de la construcción YC3.6. Los mutantes que presentaron producto de amplificación con la pareja de cebadores L-R, con la pareja YC3.6L-YC3.6R y con alguna de las parejas L/R-LbB1/LB3 fueron seleccionados. Estas plantas heterocigóticas de la F_1 se autocruzaron y se recogieron sus semillas (F_2). Con estas semillas se repitió el proceso hasta que se obtuvo uno o varios mutantes en los que no hubo amplificación con la pareja de cebadores L-R, pero sí con la pareja YC3.6L-YC3.6R y con alguna de las parejas L/R-LbB1/LB3; estos mutantes eran homocigóticos insercionales y contenían la construcción YC3.6.

II.9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

II.9.1. Expresión génica en los mutantes *cax3* y *cngc19*

Las semillas de los genotipos mutantes *cax3* y *cngc19* se esterilizaron y sembraron como se describe en el **apartado II.1**, y se mantuvieron dos días a 4 °C en oscuridad. A continuación, las placas se colocaron verticalmente en la cámara de cultivo. Tras 7 días de crecimiento (tiempo 0 h), las plántulas fueron transferidas a otras placas con medio de cultivo sólido que contenían la misma solución nutritiva descrita en la **Tabla 2**, en ausencia o no (2 µM) de H₃BO₃ en el medio. A las 6 y 24 horas desde el inicio de los tratamientos se recogieron las muestras de las raíces y se realizaron los diferentes análisis de expresión como se describe en los **apartados II.2-6**.

II.9.2. Expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de EGTA, ABA o U73122

Las semillas del genotipo Col-0 se esterilizaron, sembraron y cultivaron como se describe en el **apartado II.9.1**. Tras 7 días de crecimiento (tiempo 0 h), las plántulas fueron transferidas a otras placas con medio de cultivo sólido que contenían la misma solución nutritiva descrita en la **Tabla 2**, en ausencia o no (2 µM) de H₃BO₃ en el medio, y en ausencia o presencia de EGTA (1 mM), ABA (5 µM) o U73122 (5 µM); los compuestos ABA y U73122 se disolvieron en metanol y DMSO, respectivamente. A las 6 y 24 horas desde el inicio de los tratamientos se realizaron los diferentes análisis de expresión.

II.10. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

II.10.1. Obtención de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana

Las semillas del genotipo silvestre se esterilizaron y sembraron como se describe en el **apartado II.1** y se mantuvieron dos días a 4 °C en oscuridad. A continuación, las placas se colocaron verticalmente en la cámara de cultivo. Tras 7 días de crecimiento, las plántulas fueron transferidas a otras placas con el mismo medio de cultivo sólido que contenían la solución nutritiva descrita en la **Tabla 2** (H₃BO₃ 2 µM). A las 24 h del

traspaso se recogieron las muestras de las raíces y se procesaron como se describe en el **apartado II.2.**

Por cada 2 g (peso fresco) de raíces se añadieron 4 mL de un tampón de extracción que contenía Tris-MES 50 mM (pH 7,6), glicerol 1,1 M, EGTA 5 mM, EDTA 5 mM, sacarosa 17 % (p/v), ácido ascórbico 1 % (p/v), PVP 1,5 % (p/v), PVPP 1,5 % (p/v), DTT 2 mM, PMSF 2 mM e inhibidor de proteasas Complete (Roche, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tejido se homogeneizó manualmente utilizando un mortero pre-enfriado. El extracto se filtró a través de una gasa Myracloth (malla de 25 μ m), el eluido se centrifugó a 3.600 g durante 10 minutos a 4 °C, y posteriormente a 7.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado resultante (Precipitado 1) se reservó y el sobrenadante se centrifugó a 100.000 g durante 60 minutos a 4 °C; el sobrenadante obtenido se descartó y se guardó el precipitado (Precipitado 2).

Ambos precipitados se homogeneizaron por separado en un mortero Douncer, en presencia de 250 μ L de un tampón de homogeneización que contenía Tris-MES 50 mM (pH 7,6), glicerol 1,1 M, EGTA 1 mM, DTT 2 mM, SDS 2 % (p/v) y KCl 10 mM. Los extractos resultantes (Extracto 1 y Extracto 2) se guardaron a - 20 °C para su posterior utilización.

II.10.2. Diseño de anticuerpos primarios

Para la obtención de anticuerpos monoclonales primarios de ratón se diseñaron péptidos correspondientes a regiones altamente antigénicas a partir de secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *ACA10*, *CAX3* y *CNGC19* (Abmart, R.P. China). En el cuadro siguiente se detallan las secuencias de estos tres péptidos antigénicos:

PROTEÍNA	PÉPTIDO
ACA10 15164-1-5/C388	CDKIPTDEEQLSR D15164-1-5
CAX3 15165-1-7/C502	CQPMNNLGEVFSA D15165-1-7
CNGC19 15167-1-2/C410	CQLQRLNTAHSNS D15167-1-2

II.10.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

El contenido total de proteína presente en ambos extractos se determinó mediante un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.). A 20 µg de proteína en 25 µL de tampón de homogeneización se le añadieron 0,2 volúmenes de un tampón de carga compuesto por SDS 1 % (p/v), Tris-HCl 60 mM (pH 8,5), azul de bromofenol 0,01 % (p/v) y 2-mercaptoetanol 5 % (v/v). Las muestras se calentaron durante 10 minutos a 65 °C antes de ser cargadas en el gel. Como marcador de masa molecular se empleó el compuesto Precision Plus Protein WesternC Standards (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con SDS. El gel separador se preparó al 10 % (p/v) de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 40:2) con SDS al 0,1 % (p/v) en tampón Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), y el gel de empaquetamiento de las muestras se preparó al 4 % (p/v) de poliacrilamida y con SDS al 0,1 % (p/v) en un tampón Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8). Para la polimerización de los geles se empleó persulfato amónico (APS) al 0,1 % (p/v), usando como agente catalizador N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) a una concentración final de 6,6 mM.

La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje inicial de 80 V hasta que las muestras pasaron desde el gel de empaquetamiento hasta el de separación, y a partir de ese momento se mantuvo un voltaje constante de 100 V. Para el desarrollo de la electroforesis se emplearon aparatos Mini-Protean II (Bio-Rad), utilizando como tampón de electroforesis de proteínas una disolución de pH 8,5 que contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 % (p/v).

II.10.4. Análisis de proteínas mediante Western-Blot

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas desde los geles hasta membranas de PVDF (Immobilon-P), de 0,45 µm de tamaño de poro, mediante el sistema Trans-Blot Turbo (BIO-RAD) aplicando un campo eléctrico de 25 V

y 1,3 A durante 40 minutos. Como tampón de transferencia se empleó una disolución que contenía NaHCO_3 10 mM, Na_2CO_3 3 mM y metanol 20 % (v/v). Antes de la utilización de la membrana PVDF, esta se sumergió en metanol y posteriormente en la solución de transferencia.

Para confirmar que la transferencia se había realizado correctamente, los geles fueron sumergidos en una solución de tinción que contenía Blue Coomassie R250 (Merck) 0,25 % (p/v), metanol 41 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v), y se mantuvieron en agitación durante 1 h. Posteriormente, los geles se lavaron con una solución compuesta de etanol 30 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v) y se mantuvieron en agitación. Finalmente, se comprobó la ausencia de las proteínas en los geles previamente transferidos.

A continuación, se procedió al bloqueo de las membranas que contenían el Extracto 1 y el Extracto 2, para lo cual se sumergieron en una disolución compuesta por PBS 1x, NaCl 0,13 mM, KCl 2 μM , Na_2HPO_4 0,01 mM, KH_2PO_4 1,7 μM (pH 7,4), Tween-20 0,1 % (v/v) y leche deshidratada sin grasa (Applichem) 5 % (p/v). Las membranas se mantuvieron con una agitación tridimensional suave (40 Hz) durante 2 h a temperatura ambiente.

Posteriormente se llevó a cabo la incubación de las membranas con el Extracto 1 y el Extracto 2 en la solución de bloqueo descrita en el párrafo anterior y con los anticuerpos primarios correspondientes. Las membranas con el Extracto 1 se incubaron con el anticuerpo anti-CNGC19 (1:250) y las del Extracto 2 con los anticuerpos anti-ACA10 (1:250) y anti-CAX3 (1:250) de forma separada. En ambos casos la incubación se mantuvo durante 12 h a 4 °C en oscuridad. Pasado ese tiempo, las membranas se sometieron a tres lavados de 15 minutos cada uno, en agitación, con la solución de lavado (solución de bloqueo sin leche deshidratada).

Finalmente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario. Para ello, se sumergieron en la disolución de bloqueo con leche deshidratada al 1 % (p/v) en presencia del anticuerpo anti-Mouse IgG, H&L Chain Specific (Goat) Peroxidase Conjugate (HRP) (Calbiochem) (1:30.000). Las membranas se mantuvieron en agitación

(40 Hz) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, las membranas fueron sometidas a tres lavados de 15 minutos cada uno, en agitación, con la solución de lavado.

El revelado de las membranas se llevó a cabo en un transiluminador Bio-Rad Gel Doc 2000 (EE.UU.) –modo luminiscencia– con el reactivo Clarity Western Substrate (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.11. ANÁLISIS HISTOQUÍMICO

El análisis de expresión de promotores se llevó a cabo mediante el ensayo histoquímico de la enzima β -glucuronidasa (líneas GUS). Así, las semillas de las líneas pACA10::GUS, pCML12::GUS, pCML24::GUS, pCPK28::GUS y pMYB15::GUS se esterilizaron, sembraron, cultivaron y transfirieron como se describe en el **apartado II.9.1**, y se sometieron a los siguientes tratamientos: adición de EGTA 1 mM, de ABA 5 μ M, de U73122 5 μ M o de DPI 10 μ M, en ausencia o no (2 μ M) de H_3BO_3 en el medio. A las 24 horas desde el inicio de los tratamientos se realizaron los análisis de expresión GUS.

Las plántulas transgénicas se incubaron durante un tiempo determinado (desde 1 hasta 3 horas en función de la línea GUS) a 37 °C en un tampón de reacción que contenía los siguientes reactivos: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido 2 mM, dimetil formamida (DMF) 1 % (v/v), Na_2 -EDTA 10 mM, Tritón-X 100 0,5 % (v/v), tampón fosfato 50 mM (pH 7,0), ferricianuro potásico 1 mM y ferrocianuro potásico 1 mM.

Las tinciones GUS se analizaron usando un microscopio Leica S8APO Stereozoom equipado con una cámara digital (Leica EC3). Las imágenes se obtuvieron con el software LAS EZ (Leica, Suiza).

Por cada tratamiento se analizaron un mínimo de 10 plantas para cada línea GUS y se recogieron las imágenes más representativas para cada tratamiento.

II.12. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE BORO

Tanto el contenido de boro soluble como el insoluble de las muestras se determinaron utilizando el método descrito por Fitzpatrick y Reid (2009), con algunas modificaciones. El material vegetal se trituró (**apartado II.2**) y el boro se extrajo con 500 μL de agua de alta pureza a 80 °C durante 30 minutos. Cada 10 minutos las muestras se agitaron en un vórtex. Posteriormente, los viales se centrifugaron a 12.500 *g* durante 10 minutos y los sobrenadantes se recolectaron; los precipitados se volvieron a resuspender en 500 μL de agua de alta pureza y se repitió el proceso. Los extractos acuosos (boro soluble) y los precipitados (boro insoluble) se almacenaron a -80 °C hasta el análisis de boro.

II.12.1. Determinación de boro soluble

Los extractos acuosos se depositaron en crisoles y se calentaron a 550 °C durante 6 horas en una mufla. Pasado este tiempo, el contenido de los crisoles se resuspendió en 1 mL de ácido clorhídrico 0,1 M y se introdujo en viales.

El contenido en boro soluble se determinó mediante el método de la H-azometina. Se preparó una solución enmascarante que contenía 20 g de acetato de amonio disueltos en 20 mL de agua de alta pureza y 10 mL de ácido acético glacial. A continuación se añadieron 0,536 g de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ y 480 μL de ácido tioglicólico al 80 % (p/p).

El reactivo de H-azometina se preparó disolviendo 360 mg de este compuesto en 15 mL de agua de alta pureza. Se agitó para su disolución con calor, se añadieron 800 mg de ácido ascórbico y, finalmente, se enrasó hasta 20 mL con agua de alta pureza.

Se tomaron 200 μL de cada extracto en viales y se les añadieron 50 μL de la solución enmascarante y 25 μL del reactivo de H-azometina. Los viales se mantuvieron en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, los viales se centrifugaron a 12.500 *g* durante 10 minutos, y se cuantificó el contenido de boro soluble a 410 nm por interpolación en una recta de calibrado realizada con ácido bórico de alta pureza.

II.12.2. Determinación de boro insoluble

Los precipitados obtenidos en el **apartado II.12** se colocaron en una estufa a 80 °C durante 72 h, y tras ese tiempo se determinó su peso seco. A continuación, se pasaron a crisoles, que se calentaron a 550 °C durante 6 h en una mufla. Las cenizas resultantes se resuspendieron en 1 mL de ácido clorhídrico 0,1 M y se introdujeron en viales.

El contenido en boro insoluble se determinó empleando el mismo método que para la cuantificación del boro soluble (**apartado II.12.1.**).

II.13. CUANTIFICACIÓN DE CATIONES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA IÓNICA

Las semillas de los genotipos Col-0 (silvestre), Col0::YC3.6, *cb1/4/5/9*, *cax3*, *aca10* y *cngc19* se esterilizaron, sembraron, cultivaron y transfirieron como se describe en el **apartado II.9.1**. Además, plántulas del genotipo silvestre fueron trasplantadas a placas con medio de cultivo sólido que contenían EGTA 1 mM, en ausencia o no (2 µM) de H₃BO₃. A las 24 horas desde el inicio de los tratamientos se realizaron los diferentes análisis.

Las raíces se trituraron y liofilizaron (Freeze Mobile 6 VirTis, EE.UU.). A este material se le añadió 1 mL de HCl 5 mM y los viales se agitaron a 25 Hz durante 15 minutos. Posteriormente, los viales se centrifugaron a 700 g durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se pasó por un filtro de 0,45 µm (Millex-LCR, EE.UU.). A continuación, los extractos filtrados se diluyeron 2 veces con agua de alta pureza y se guardaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

La cuantificación de la concentración de cationes en los extractos obtenidos se llevó a cabo en un cromatógrafo iónico (Dionex DX-500, EE.UU.), provisto de las columnas de intercambio iónico CG12A y CS12A, así como de una columna supresora CSRS-300. El caudal de la fase móvil fue de 1 mL · min⁻¹ y se empleó ácido metasulfónico 20 mM como agente eluyente.

La concentración de los cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ y Na^+ se calculó con el programa de cromatografía Chromeleon/Peaknet 6.7 por comparación de las áreas de los picos con patrones conocidos.

Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra.

II.14. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS DE LAS RAÍCES PRINCIPALES

Las semillas del genotipo silvestre Col-0 y de las líneas homocigóticas insercionales *aca10*, *cax3*, *cbl1/4/5/9*, *cml24*, *cngc19*, *gata4*, *myb15* y *wrky46* se esterilizaron y sembraron como se describe en el **apartado II.1**, y se mantuvieron 5 días a 4 °C en oscuridad. A continuación, las placas se colocaron verticalmente en la cámara de cultivo de placas. Tras 5 días de crecimiento (tiempo 0 h), las plántulas fueron transferidas a otras placas con medio de cultivo sólido que contenían la misma solución nutritiva descrita en la **Tabla 2**, en ausencia o no (2 μM) de H_3BO_3 en el medio.

Se llevó a cabo un seguimiento del crecimiento longitudinal de la raíz principal de las plántulas mediante la captura de imágenes en un escáner (HP Scanjet G3010) a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores al traspaso.

La longitud de las raíces principales se determinó con el software Optimas 6.1 (Media Cybernetics, EE.UU.) y los datos se exportaron a un archivo Excel para su procesamiento. Se analizaron un mínimo de 25 plantas independientes para cada tratamiento.

II.15. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS DE LOS ÁPICES

Las semillas del genotipo Col-0 y de las homocigóticas insercionales *bzip34*, *cbl1/4/5/9*, *gata4*, *myb15* y *wrky46* se esterilizaron, sembraron, cultivaron y transfirieron como se describe en el **apartado II.14**. A las 24 horas desde el inicio de los tratamientos se realizaron las medidas que se detallan a continuación.

II.15.1. Cuantificación del grosor apical

El diámetro del ápice de la raíz principal se midió en las plántulas de los genotipos Col-0, *bzip34*, *cbl1/4/5/9*, *gata4*, *myb15* y *wrky46* mediante la captura de imágenes en un escáner (HP Scanjet G3010) a las 24 horas posteriores al traspaso.

El diámetro apical se determinó con el software Optimas 6.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, EE.UU.) y los datos se exportaron a un archivo Excel para su procesamiento. Se analizaron un mínimo de 50 plantas independientes para cada tratamiento.

II.15.2. Análisis de la morfología apical

Estas determinaciones se realizaron en los genotipos Col-0, *bzip34*, *cbl1/4/5/9*, *gata4*, *myb15* y *wrky46* usando un microscopio Leica S8APO Stereozoom equipado con una cámara digital (Leica EC3) a las 24 horas posteriores al traspaso. Las imágenes se obtuvieron con el software LAS EZ (Leica, Suiza).

Por cada tratamiento se analizaron un mínimo de 10 plantas para cada línea y se recogieron las imágenes más representativas de cada tratamiento.

II.16. ANÁLISIS DEL CALCIO CITOSÓLICO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

II.16.1 Análisis de la línea transgénica Col0::YC3.6

Las semillas de esta línea se esterilizaron y sembraron como se describe en el **apartado II.1**, y se mantuvieron dos días a 4 °C en oscuridad. A continuación, las placas se colocaron verticalmente en la cámara de cultivo. Tras 5 o 6 días de crecimiento, las plántulas fueron transferidas a otras placas con medio de cultivo sólido que contenían la misma solución nutritiva descrita en la **Tabla 2**, en ausencia o no (2 µM) de H₃BO₃ en el medio. A las 6 y 24 horas desde el inicio de los tratamientos se obtuvieron las imágenes en un microscopio confocal invertido (Leica; SP5 MP, DMI6000). La radiación de excitación fue proporcionada por una lámpara de argón con un filtro de 458 nm (intensidad al 30 %) y los filtros de emisión fueron de 480/20 nm (ECFP) y 535/15 nm (cpVenus).

La adquisición de las imágenes se llevó a cabo con el software Lasaf (Leica) y los cálculos de los ratios se realizaron empleando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Cada plántula se sumergió en una solución nutritiva líquida (**Tabla 2**) sin la adición de phytigel, en ausencia o no (2 μM) de H_3BO_3 , entre un cubre y un portaobjetos para mantener las raíces en una posición fija y proceder con las mediciones de fluorescencia.

Por cada tratamiento se analizaron un mínimo de 20 plantas y se recogieron las imágenes más representativas de cada tratamiento.

II.16.2. Imágenes en microscopio confocal en presencia de diversos compuestos

Las semillas de la línea transgénica Col0::YC3.6 se esterilizaron, sembraron, cultivaron y transfirieron como se describe en el **apartado II.16**. El efecto de diversos compuestos relacionados con el calcio, en ausencia o no (2 μM) de H_3BO_3 , se analizó a las 6 y 24 horas desde el inicio de los tratamientos. Los compuestos y concentraciones de los tratamientos fueron las siguientes:

+ ABA 5 μM	– ABA
+ EGTA 1 mM	– EGTA
+ ABA 5 μM , + EGTA 1 mM	– ABA, – EGTA
+ U73122 1 o 5 μM	– U73122
+ U73122 1 μM , + EGTA 1 mM	– U73122, – EGTA

Las medidas se realizaron como se describe en el **apartado II.16.1**.

II.16.3. Imágenes en microscopio confocal con recuperación de boro

Las semillas de la línea transgénica Col0::YC3.6 se esterilizaron, sembraron, cultivaron y transfirieron como se describe en el **apartado II.16.1**. Tras 24 horas en los medios con y sin boro, las plántulas fueron transferidas nuevamente a otras placas con

medio de cultivo sólido que contenían la misma solución nutritiva descrita en la **Tabla 2**, en presencia (2 μ M) de H_3BO_3 en el medio. Las medidas se realizaron como se describe en el **apartado II.16.1** transcurridas 1, 3, 6 y 24 horas desde el segundo traspaso.

II.16.4. Imágenes en microscopio confocal de diferentes mutantes

Las semillas de diversas líneas transgénicas que se relacionan en el siguiente cuadro se esterilizaron, sembraron, cultivaron, transfirieron y se sometieron a los tratamientos de ausencia o no (2 μ M) de H_3BO_3 como se describe en el **apartado II.16.1**. En este caso los análisis se realizaron solo a las 24 horas desde el inicio de los tratamientos.

<i>cngc19::YC3.6</i>	<i>cax3::YC3.6</i>	<i>cml24::YC3.6</i>
<i>cpk28::YC3.6</i>	<i>cpk29::YC3.6</i>	<i>aca10::YC3.6</i>
<i>cbl1/4/5/9::YC3.6</i>	<i>bzip34::YC3.6</i>	<i>myb15::YC3.6</i>
<i>gata4::YC3.6</i>	<i>wrky46::YC3.6</i>	

II.17. ANÁLISIS DEL CALCIO CITOSÓLICO MEDIANTE MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Las semillas de la línea transgénica Col0::YC3.6 se esterilizaron, sembraron, cultivaron y transfirieron como se describe en el **apartado II.16.1**. A las 6 y 24 horas desde el inicio de los tratamientos se obtuvieron las imágenes en un microscopio de fluorescencia invertido (Leica; DMI6000B), equipado con un filtro de emisión (Ludl Electronic Products) y una cámara Orca ER CCD (Hamamatsu, <http://www.hamamatsu.com>), como se describe en Krebs et al. (2012). La excitación fue proporcionada por una lámpara de xenón con un filtro de 436/20 nm y los filtros de emisión fueron de 485/30 nm (ECFP) y 535/40 nm (cpVenus).

La adquisición de las imágenes y los cálculos de los ratios se llevaron a cabo empleando el software Openlab 5.2 (Perkin Elmer, <http://www.cellularimaging.com>). Las raíces se mantuvieron en una posición fija como se describe en el **apartado II.16**.

Por cada tratamiento se analizaron un mínimo de 10 plantas y se recogieron las imágenes más representativas de cada tratamiento.

Estas determinaciones se realizaron en el Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universidad de Münster (Alemania).

II.18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se representan en los experimentos realizados con las plantas de arabidopsis se corresponden con la media y la desviación estándar de todos los análisis individuales. Los resultados se analizaron mediante el test de *t*-Student.

III. RESULTADOS

III.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

III.1.1. Análisis de la expresión génica mediante microarrays

Con el objetivo de conocer los efectos de la deficiencia de B a corto plazo (24 h) se llevaron a cabo análisis por microarrays en las raíces de plantas de arabidopsis. En estas condiciones aproximadamente 1.000 genes tuvieron una expresión diferencial con un p -valor inferior a 0,05. Estos datos se obtuvieron por nuestro grupo de investigación con anterioridad a esta tesis doctoral.

Los análisis mostraron que la deficiencia de B afectó a la expresión de un amplio número de genes relacionados con la señalización de Ca^{2+} , transporte de B, transporte de potasio y determinados factores de transcripción (**Tabla 5**).

Tabla 5. Expresión diferencial de genes involucrados en la señalización de Ca^{2+} , transporte de B y de potasio y factores de transcripción en las raíces de plantas de arabidopsis cultivadas con suficiencia (+) o deficiencia (-) en B. Los niveles de expresión diferencial se expresan como el cociente entre la señal de las muestras deficientes en B y la señal de las muestras suficientes en B (FC). Los valores negativos indican represión y los valores positivos indican sobreexpresión. La corrección del ruido de fondo y la normalización de los datos se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. Solo se muestran aquellos genes para los que se obtuvo un p -valor < 0,05 a las 24 h de deficiencia en B.

DESCRIPCIÓN DEL GEN	FC (-B/+B) 24 h	GEN
A. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}		
Canal iónico 19 regulado por nucleótidos cíclicos (<i>CNGC19</i>)	2,74	AT3G17690
Intercambiador 3 de cationes/ H^+ (<i>CAX3</i>)	1,48	AT3G51860
Calcio-ATPasa tipo P_{IB} de membrana plasmática (<i>ACA</i>)		
<i>ACA1</i>	1,43	AT1G27770
<i>ACA10</i>	1,28	AT4G29900
<i>ACA12</i>	1,32	AT3G63380
<i>ACA13</i>	1,48	AT3G22910
Proteínas similares a calmodulina (<i>CML</i>)		
<i>CML11</i>	1,66	AT3G22930
<i>CML12</i>	4,51	AT2G41100
<i>CML23</i>	2,07	AT1G66400
<i>CML24</i>	1,92	AT5G37770
<i>CML30</i>	1,87	AT3G29000
<i>CML37</i>	1,84	AT5G42380
<i>CML45</i>	2,59	AT5G39670
<i>CML47</i>	2,36	AT3G47480

Proteínas quinasas dependientes de calcio (<i>CPK</i>)		
<i>CPK1</i>	1,38	AT1G18890
<i>CPK28</i>	1,64	AT5G66210
<i>CPK29</i>	1,63	AT1G76040
Proteínas similares a calcineurina B (<i>CBL</i>)		
<i>CBL1</i>	1,24	AT4G17615
<i>CBL3</i>	- 1,16	AT4G01420
<i>CBL4</i>	1,31	AT5G24270
<i>CBL5</i>	1,10	AT4G01420
<i>CBL9</i>	- 1,48	AT5G47100
<i>CBL10</i>	- 1,14	AT4G33000
Proteína quinasa 23 de interacción con CBL (<i>CIPK23</i>)	- 1,20	AT1G30270
Anexina 2 de unión a calcio (<i>ATANN2</i>)	1,55	AT5G65020
Proteína 1 de unión a pinoid (<i>PBP1</i>)	1,99	AT5G54490
B. Genes relacionados con el transporte de boro		
Canal 5;1 de ácido bórico (<i>NIP5;1</i>)	1,59	AT4G10380
Transportador 1 de boro (<i>BOR1</i>)	1,14	AT2G47160
C. Genes relacionados con el transporte de potasio		
Canal 1 de potasio (<i>AKT1</i>)	1,04	AT2G26650
Canal de potasio (<i>SKOR</i>)	- 1,86	AT3G02850
Transportador 5 de potasio (<i>HAK5</i>)	1,94	AT4G13420
D. Genes que codifican factores de transcripción		
Factor de transcripción GATA4 (<i>GATA4</i>)	- 1,63	AT3G60530
Factores de transcripción de la familia bZIP		
<i>bZIP34</i>	- 2,53	AT2G42380
<i>bZIP61</i>	- 1,32	AT3G58120
Factores de transcripción de la familia MYB		
<i>MYB14</i>	1,84	AT2G31180
<i>MYB15</i>	3,39	AT3G23250
<i>MYB78</i>	1,94	AT5G49620
Factores de transcripción de la familia WRKY		
<i>WRKY38</i>	1,79	AT5G22570
<i>WRKY40</i>	2,34	AT1G80840
<i>WRKY46</i>	2,71	AT2G46400

III.1.2. Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre mediante Q-RT-PCR

Para confirmar los resultados obtenidos mediante análisis por microarrays, se determinó la expresión diferencial de ciertos genes seleccionados entre los afectados por la deficiencia en B, a las 6 y 24 h, en las raíces de arabidopsis empleando la técnica Q-RT-PCR.

III.1.2.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}

El análisis de los genes *CAX3* (Figura 6A) y *CNGC19* (Figura 6B) mostró una mayor expresión de ambos tanto a 6 como a 24 h de deficiencia en B comparado con el tratamiento de B. Es de destacar que el gen *CNGC19* ya presentó una elevada expresión a las 6 h de deficiencia. Los datos de expresión de estos genes se corresponden con los de microarrays (Tabla 5A).

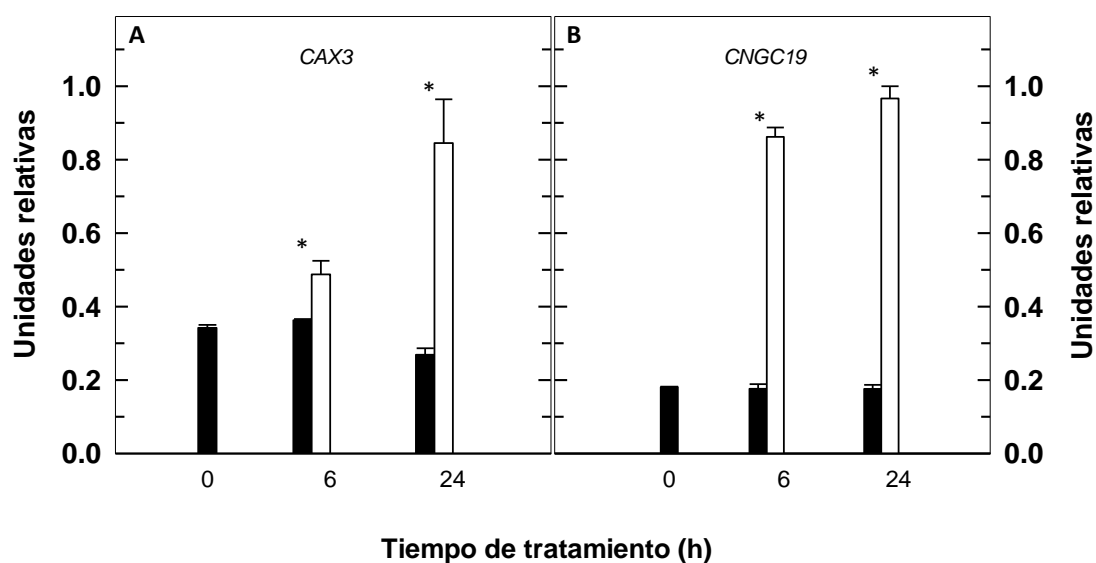


Figura 6. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CAX3* (A) y *CNGC19* (B) en las raíces de plantas de arabidopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (*p*-valor < 0,05).

El estudio de la expresión de los genes *ACA1*, *ACA10*, *ACA12* y *ACA13* se muestra en la **Figura 7**. La expresión de los genes *ACA* analizados fue mayor en condiciones de deficiencia de B a las 6 y 24 h de tratamiento, lo cual se corresponde con los datos obtenidos en microarrays (**Tabla 5A**). No obstante, las sobreexpresiones del gen *ACA1* a las 6 h y de *ACA12* a las 24 h no fueron estadísticamente significativas.

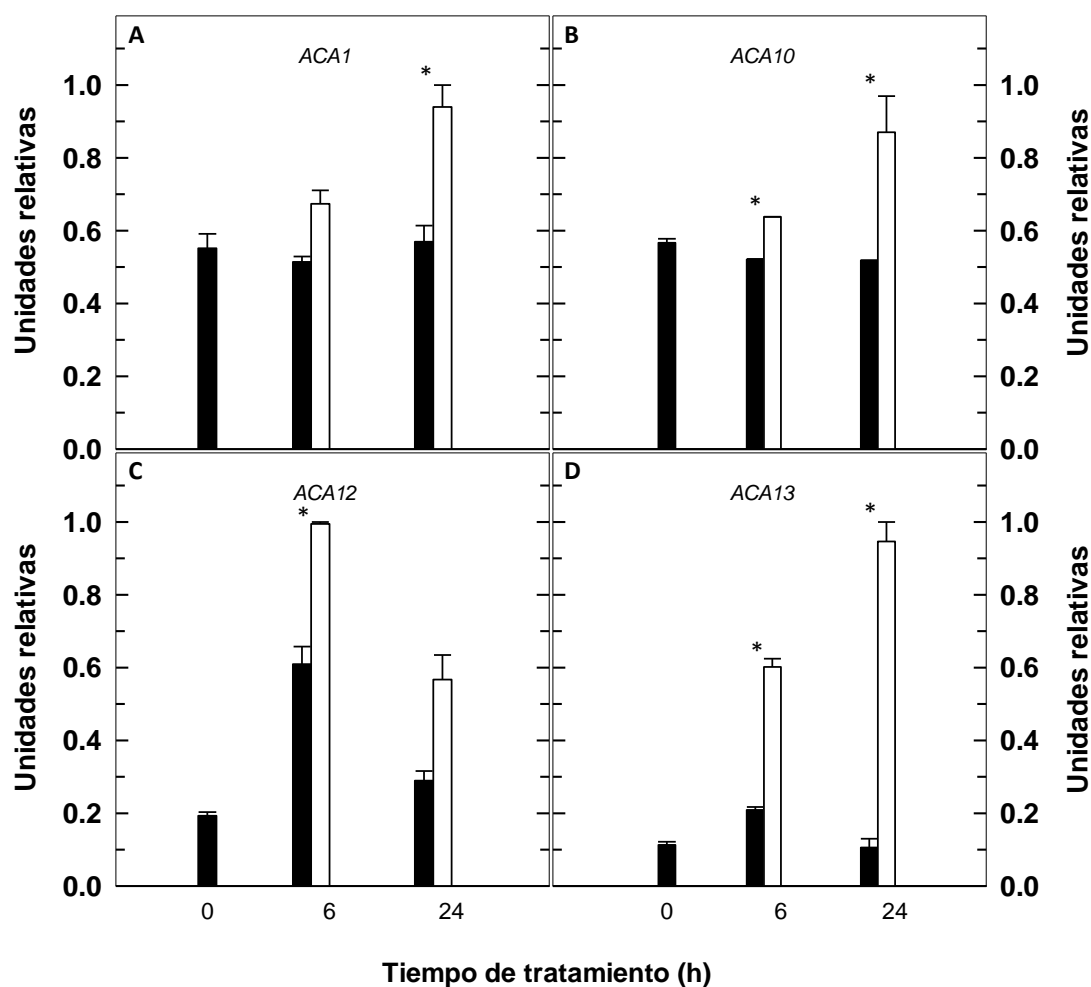


Figura 7. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *ACA1* (A), *ACA10* (B), *ACA12* (C) y *ACA13* (D) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (*p*-valor < 0,05).

En la **Figura 8** se recogen los estudios de expresión de los genes que codifican algunas de las CML que mostraron una mayor expresión tras 24 h de deficiencia de B en los análisis de microarrays (**Tabla 5A**). En los cuatro genes se observó un mayor contenido de transcritos tanto a las 6 como a las 24 h de tratamiento con deficiencia de B (**Figura 8**).

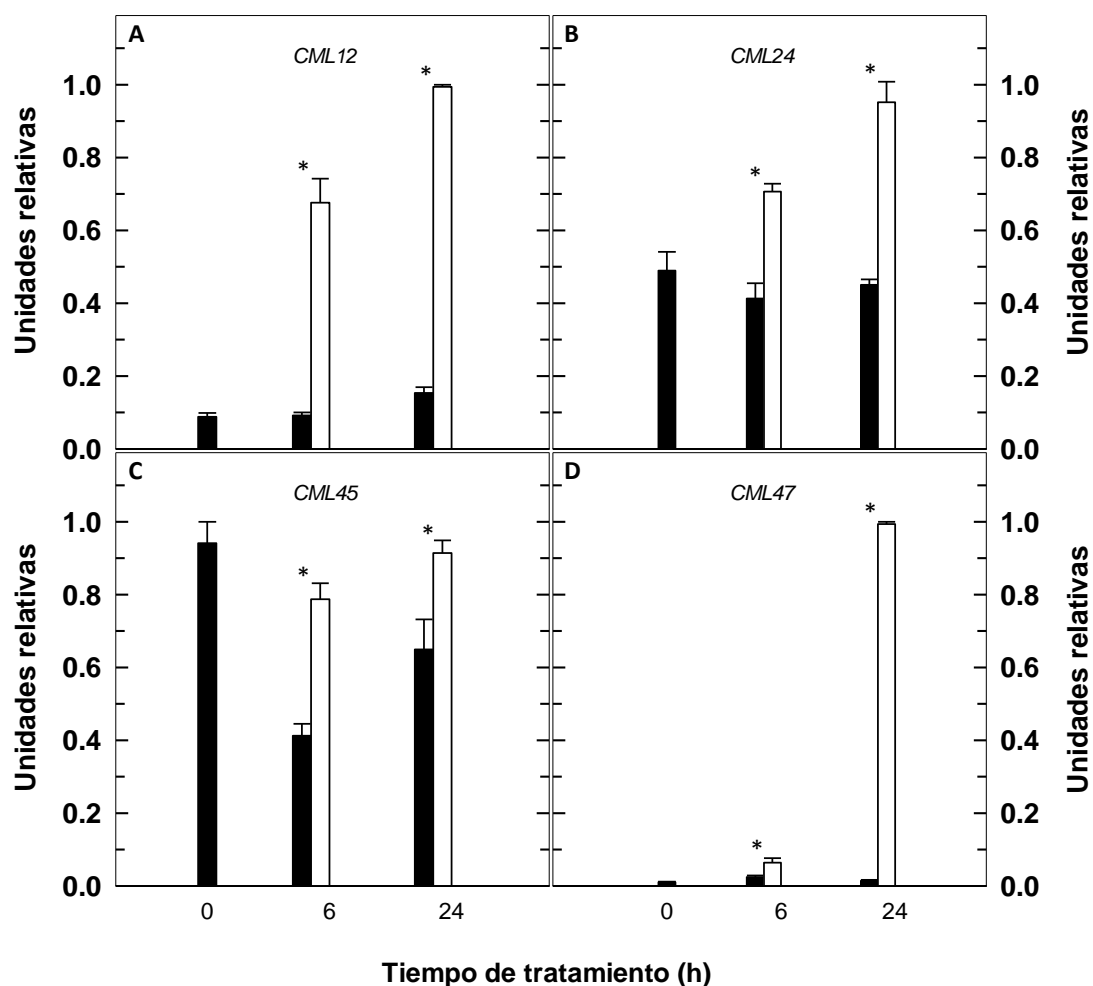


Figura 8. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CML12* (A), *CML24* (B), *CML45* (C) y *CML47* (D) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05).

En la **Figura 9** se muestra el análisis de expresión de los genes *CBL1*, *CBL3*, *CBL4*, *CBL9*, *CBL10* (**Figura 9A-E**) y, además, *CIPK23* (**Figura 9F**). Las expresiones de los genes *CBL1*, *CBL4*, *CBL9* y *CBL10* se corresponden con las de los microarrays (**Figura 9A,C-E** y **Tabla 5A**). Así, a las 24 h de deficiencia de B, la expresión de *CBL1* y *CBL4* fue mayor mientras que la de *CBL9* y *CBL10* menor (**Figura 9A,C-E**). El gen *CBL4* fue el único que se sobreexpresó tanto a las 6 como a las 24 h del tratamiento con déficit de B. Finalmente, la deficiencia de B no causó ningún efecto sobre el patrón de expresión de *CIPK23* ni a las 6 ni a las 24 h (**Figura 9F**).

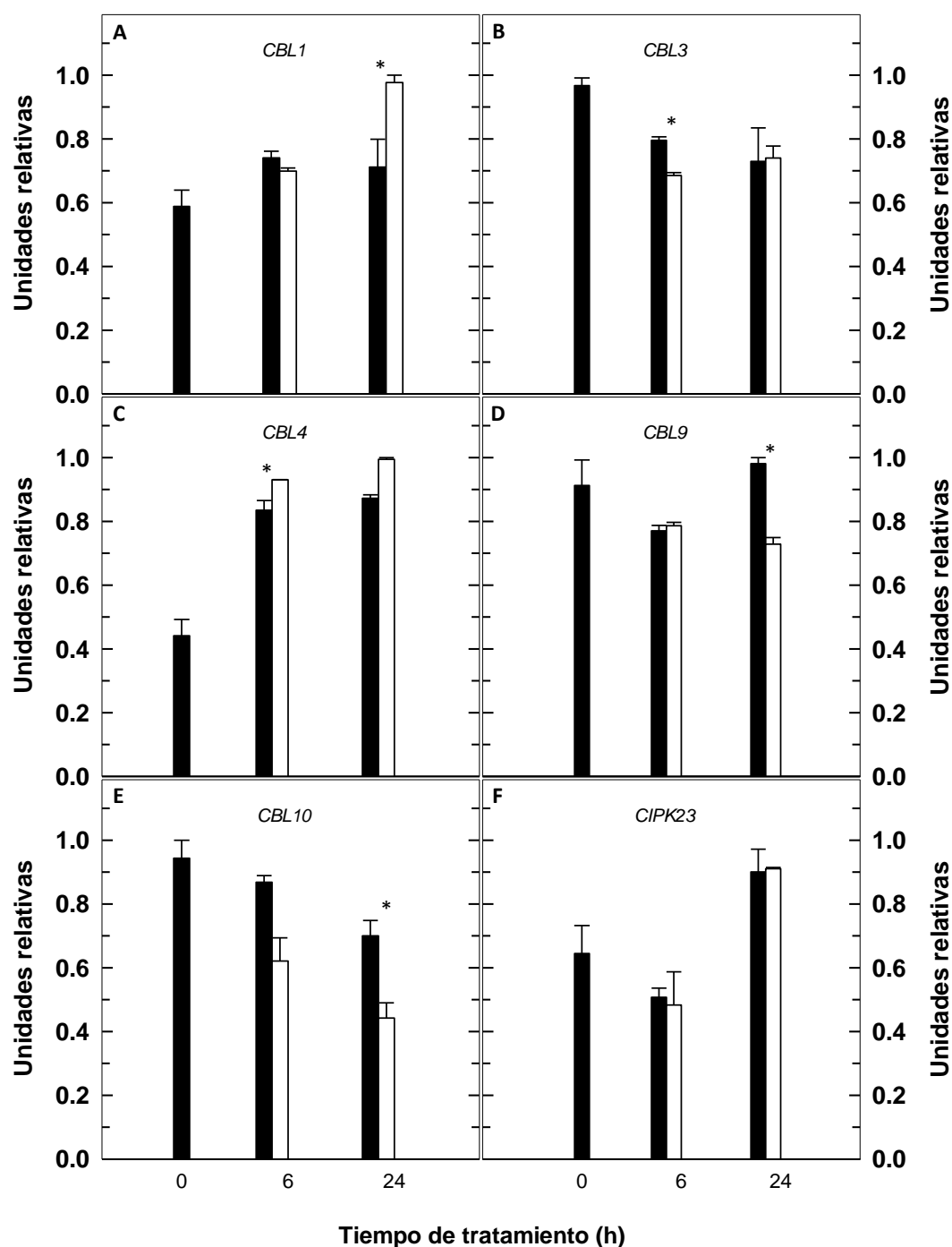


Figura 9. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CBL1* (A), *CBL3* (B), *CBL4* (C), *CBL9* (D), *CBL10* (E) y *CIPK23* (F) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$).

El análisis de expresión de los genes *CPK28* y *CPK29* mostró que ambos se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de deficiencia en B (**Figura 10**). Estos datos coinciden con los obtenidos por microarrays (**Tabla 5A**).

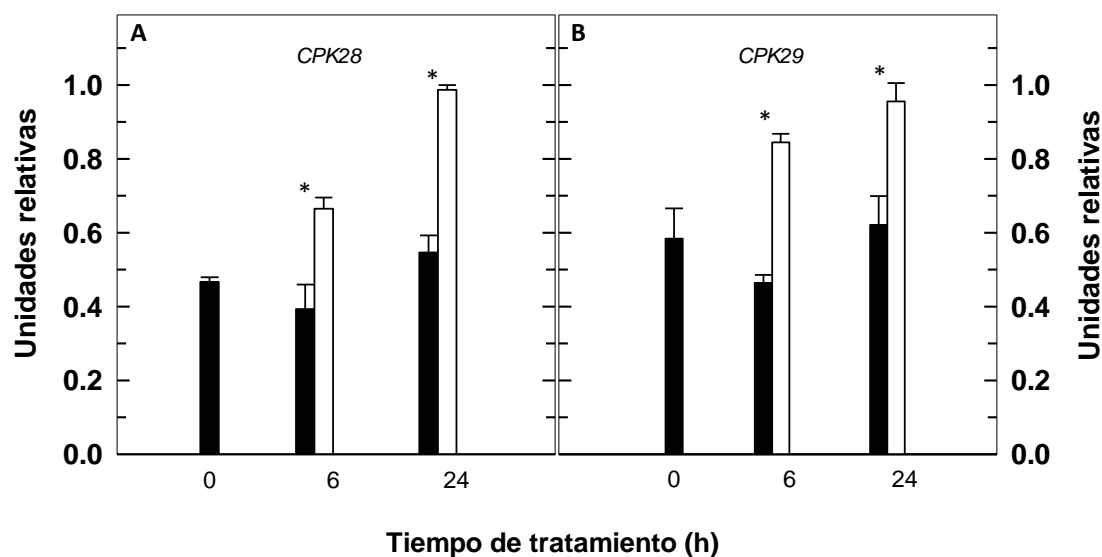


Figura 10. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CPK28* (A) y *CPK29* (B) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05).

En la **Figura 11** se representa el efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de expresión de los genes *ATANN2* y *PBP1*. El gen *ATANN2* se sobreexpresó tras 24 h de tratamiento con ausencia de B (**Figura 11A**). Por su parte, el gen *PBP1* tuvo mayores niveles de transcritos tanto a las 6 como a las 24 h de deficiencia en B en comparación con el tratamiento control (**Figura 11B**). Estos resultados también se corresponden con los de microarrays (**Tabla 5A**).

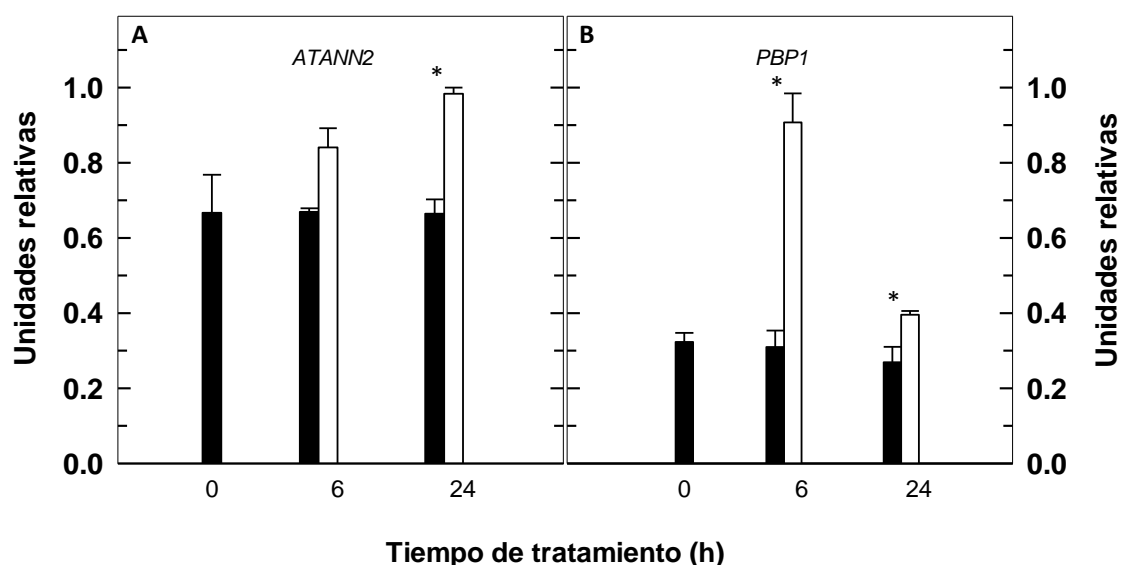


Figura 11. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *ATANN2* (A) y *PBP1* (B) en las raíces de plantas de *arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05).

III.1.2.2. Genes relacionados con el transporte de boro

Se estudió también por Q-RT-PCR la expresión de los transportadores de B *BOR1* (Figura 12A) y *NIP5;1* (Figura 12B). Ambos genes se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de deficiencia en B. Estos datos se corresponden con los obtenidos por microarrays (Tabla 5B).

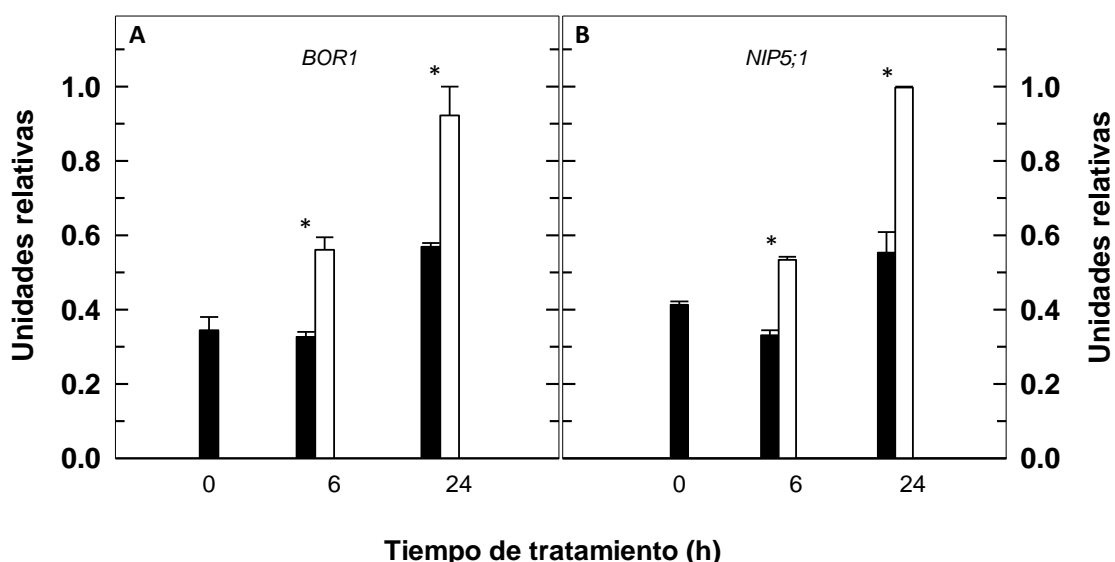


Figura 12. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *BOR1* (A) y *NIP5;1* (B) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05).

III.1.2.3. Genes relacionados con el transporte de potasio

En la Figura 13 se muestra el análisis de expresión para los genes relacionados con el transporte de potasio en las raíces de *Arabidopsis*. Mientras que la expresión de los genes *AKT1* y *SKOR* no se vio afectada por la deficiencia en B (Figura 13A,C), la de *HAK5* se sobreexpresó tras 6 y 24 h de tratamiento con déficit de B (Figura 13B); estos resultados de expresión de *HAK5* se corresponden con los de microarrays (Tabla 5C).

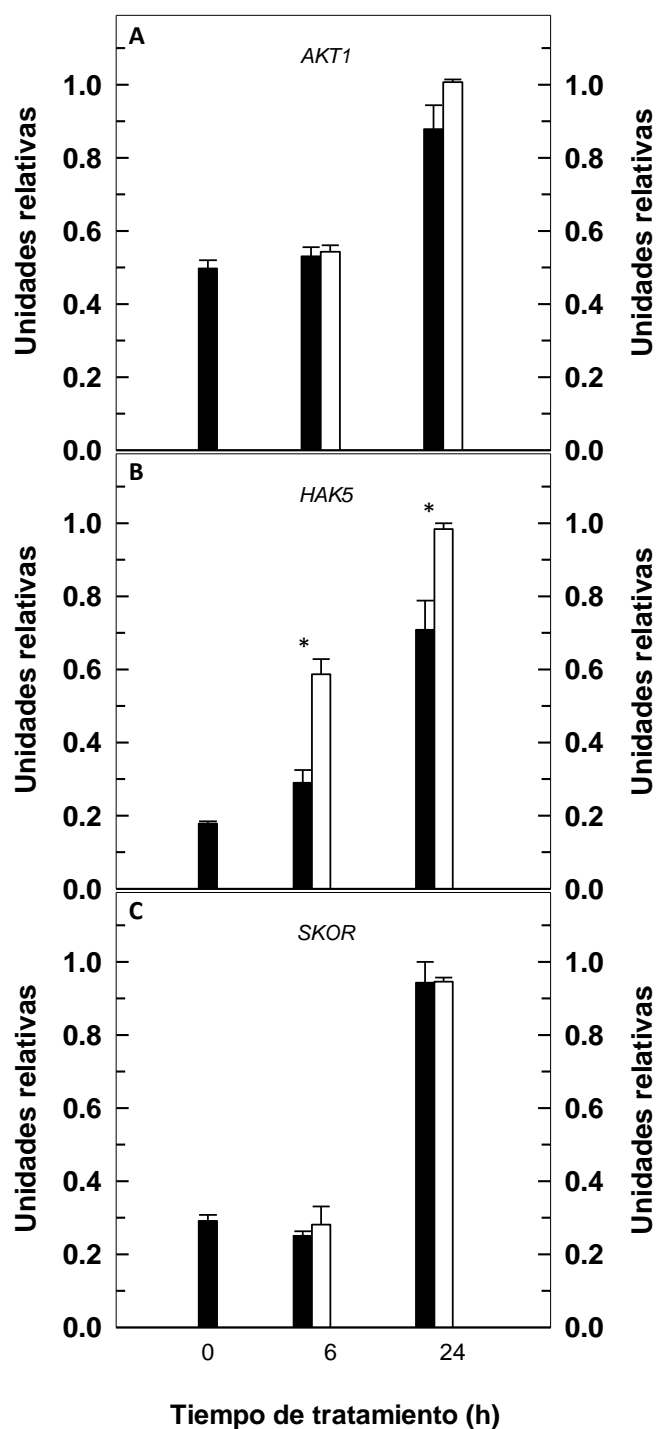


Figura 13. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *AKT1* (A), *HAK5* (B) y *SKOR* (C) en las raíces de plantas de *arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$).

III.1.2.4. Genes que codifican factores de transcripción

Los genes *bZIP34* y *bZIP61* se reprimieron tras 24 h de tratamiento con deficiencia de B (**Figura 14A,B**). Por su parte, *MYB14* y *MYB15* se sobreexpresaron tras 6 h de deficiencia en B (**Figura 14C,D**); sin embargo, solo el segundo se sobreexpresó significativamente a las 24 h. El factor de transcripción *GATA4* tuvo menores niveles de transcritos en deficiencia que en presencia de B tanto a las 6 como a las 24 h desde el inicio de los tratamientos (**Figura 14E**). *WRKY46* se sobreexpresó tras 6 y 24 h de deficiencia en B (**Figura 14F**). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los microarrays (**Tabla 5D**), a excepción del gen *MYB14* cuya sobreexpresión a las 24 h de déficit de B no fue significativa (**Figura 14C**).

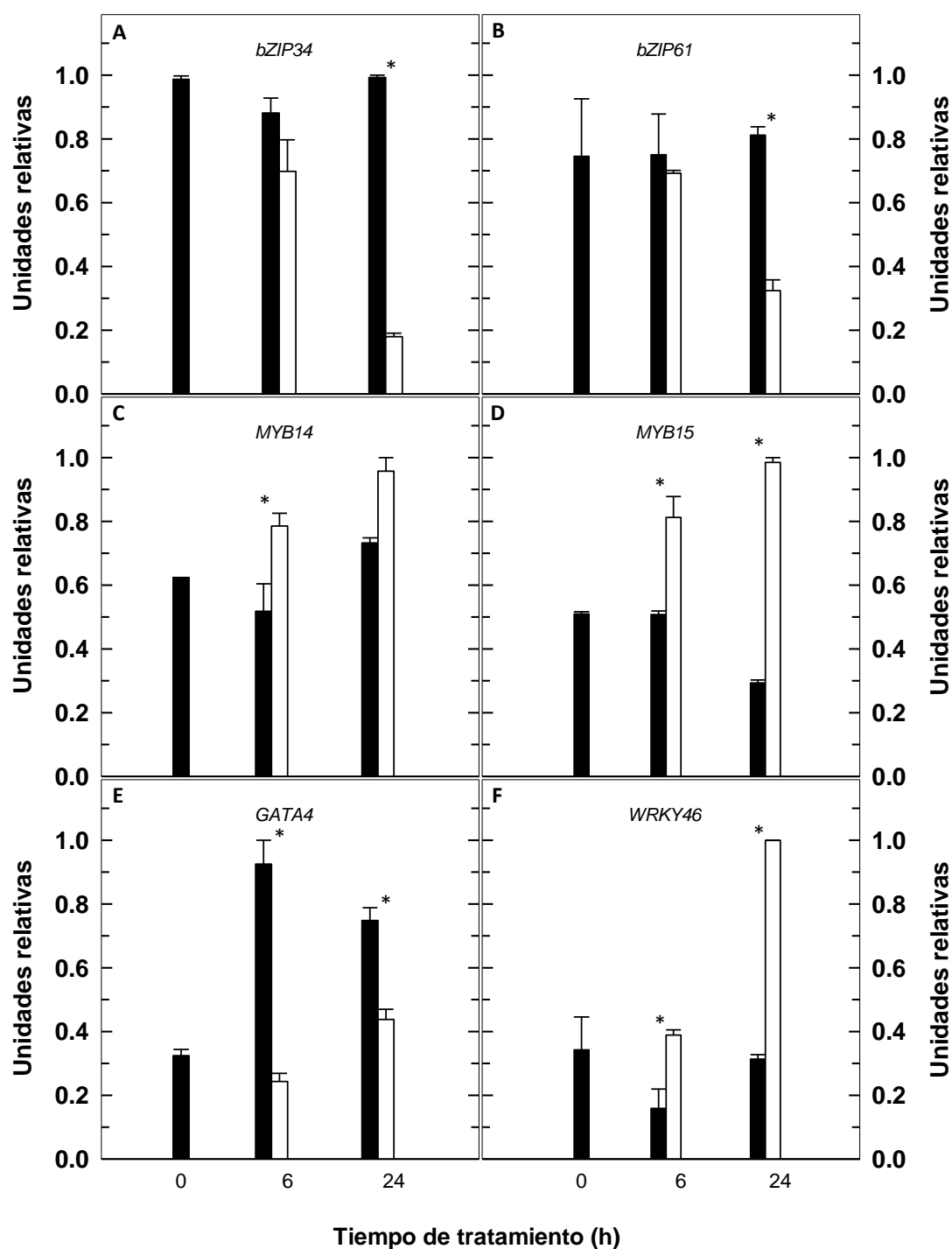


Figura 14. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *bZIP34* (A), *bZIP61* (B), *MYB14* (C), *MYB15* (D), *GATA4* (E) y *WRKY46* (F) en las raíces de plantas de arabis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (*p*-valor < 0,05).

III.1.3. Análisis de la expresión génica en el mutante *cax3* mediante Q-RT-PCR

Con el objetivo de investigar si la mutación del gen *CAX3* pudiera alterar la expresión de los genes analizados en el **apartado III.1.2**, se emplearon líneas homocigóticas insercionales obtenidas como se describe en el **apartado II.7** de Materiales y Métodos. Así, se estudió la expresión diferencial de ciertos genes afectados por la deficiencia en B, durante 6 y 24 h, en las raíces del mutante *cax3* y del genotipo silvestre Col-0.

III.1.3.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}

En la **Figura 15** se muestra la expresión de los genes *ACA10* y *CNGC19*. Aunque estos dos genes se sobreexpresaron en ambos genotipos tras 6 y 24 h de tratamiento con deficiencia de B en comparación con el de suficiencia, la expresión de *CNGC19* fue significativamente mayor en Col-0 que en el mutante *cax3* tras 24 h de deficiencia en B (**Figura 15A,B**).

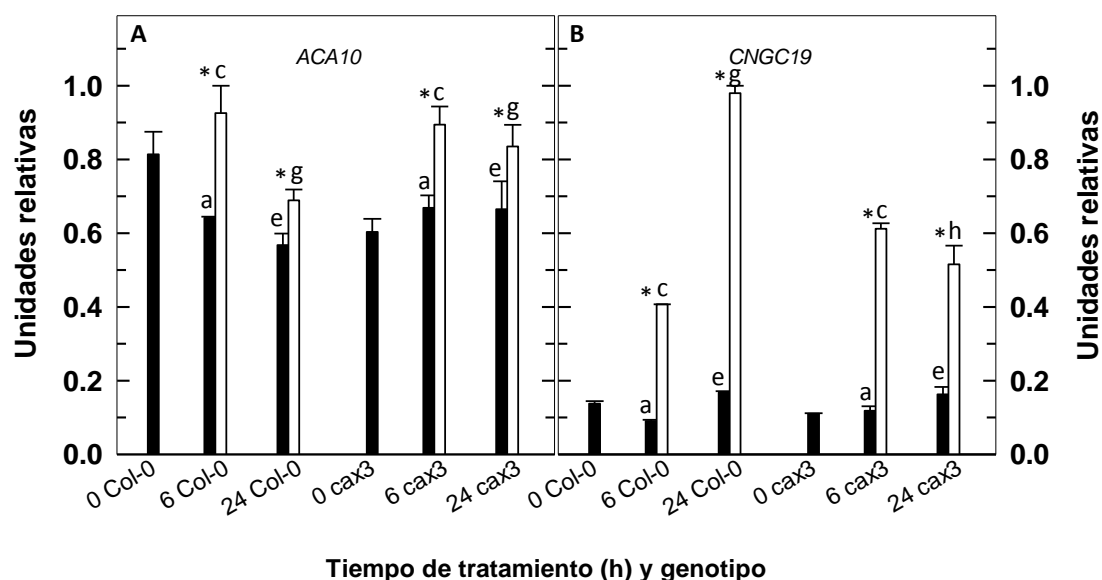


Figura 15. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *ACA10* (A) y *CNGC19* (B) en las raíces de arábidopsis de los genotipos silvestre y mutante *cax3* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

La expresión de los genes *CBL1*, *CBL4*, *CBL9* y *CIPK23* mostró un patrón diferente para cada uno (**Figura 16A-D**). El gen *CBL1* se sobreexpresó significativamente tras 24 h de déficit de B en el genotipo silvestre (Col-0), sin embargo, no se observó este efecto en el mutante *cax3*. En el genotipo Col-0, *CBL4* tuvo mayores niveles de transcritos a las 6 y 24 h de deficiencia en B, pero no se obtuvieron estas diferencias en el mutante (**Figura 16B**). En el caso de *CBL9*, este gen se reprimió tras 24 h de ausencia de B en ambos genotipos (**Figura 16C**). *CIPK23* se reprimió tras 6 y 24 h de deficiencia en B en el genotipo mutante, pero no en Col-0 (**Figura 16D**). Interesantemente, los niveles de expresión de los genes *CBL1*, *CBL4* y *CIPK23* en el mutante *cax3* a las 24 h de deficiencia de B fueron significativamente menores que en el genotipo Col-0; estas diferencias no se observaron cuando ambos genotipos se cultivaron en presencia de B (**Figura 16A,B,D**).

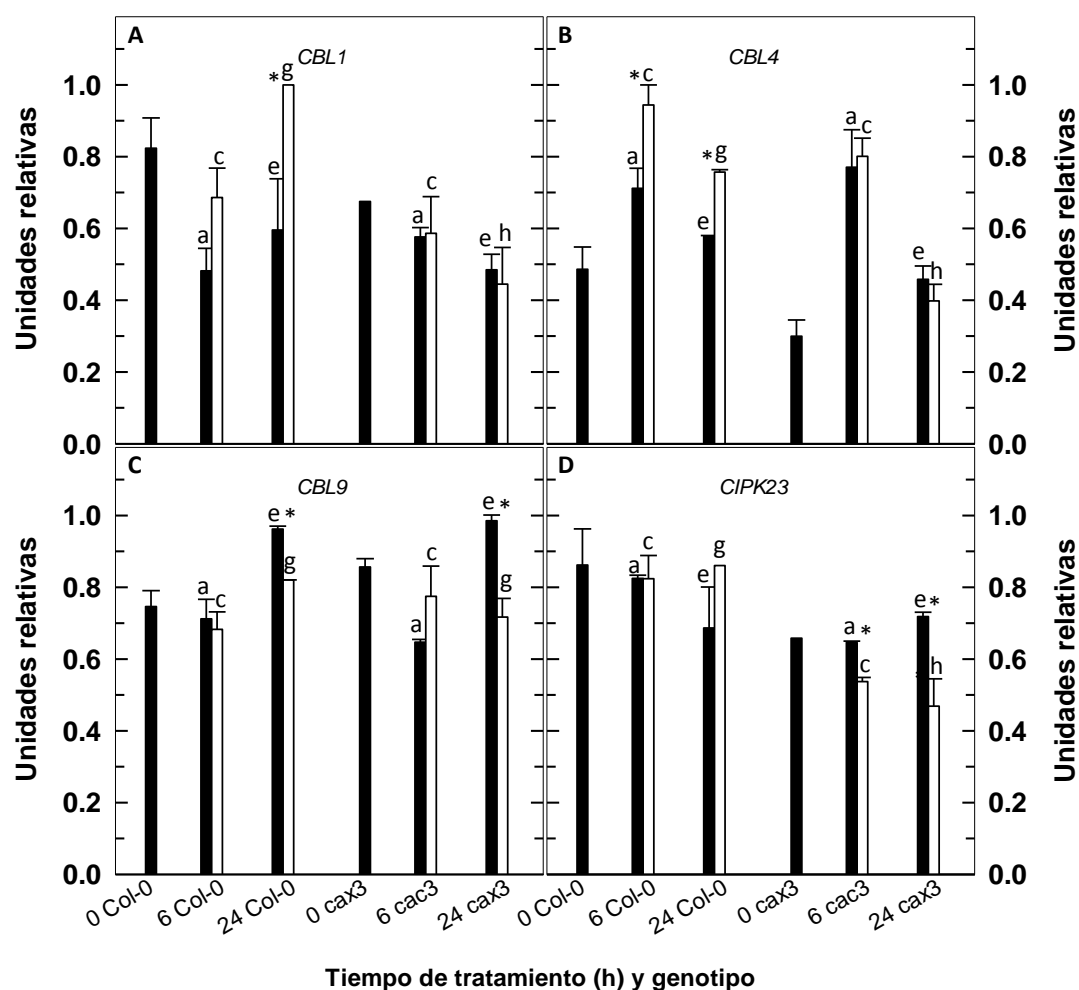


Figura 16. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CBL1* (A), *CBL4* (B), *CBL9* (C) y *CIPK23* (D) en las raíces de arabisopsis de los genotipos silvestre y mutante *cax3* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

En la **Figura 17** se incluye la expresión de los genes *CPK28*, *CPK29* y *CML24*. El gen *CPK28* se sobreexpresó a las 6 y 24 h de tratamiento con ausencia de B en Col-0, pero en el genotipo mutante *cax3* solo se observó tras 6 h (**Figura 17A**). *CPK29* se sobreexpresó tanto a las 6 como a las 24 h de deficiencia en B en ambos genotipos. Los niveles de expresión de los genes *CPK28* y *CPK29* en el mutante *cax3* a las 24 h de deficiencia en B fueron significativamente menores que en el genotipo silvestre (**Figura 17A,B**). Finalmente, *CML24* se sobreexpresó a las 6 y 24 h de déficit de B en el genotipo silvestre, pero solo a las 6 h en el mutante (**Figura 17C**).

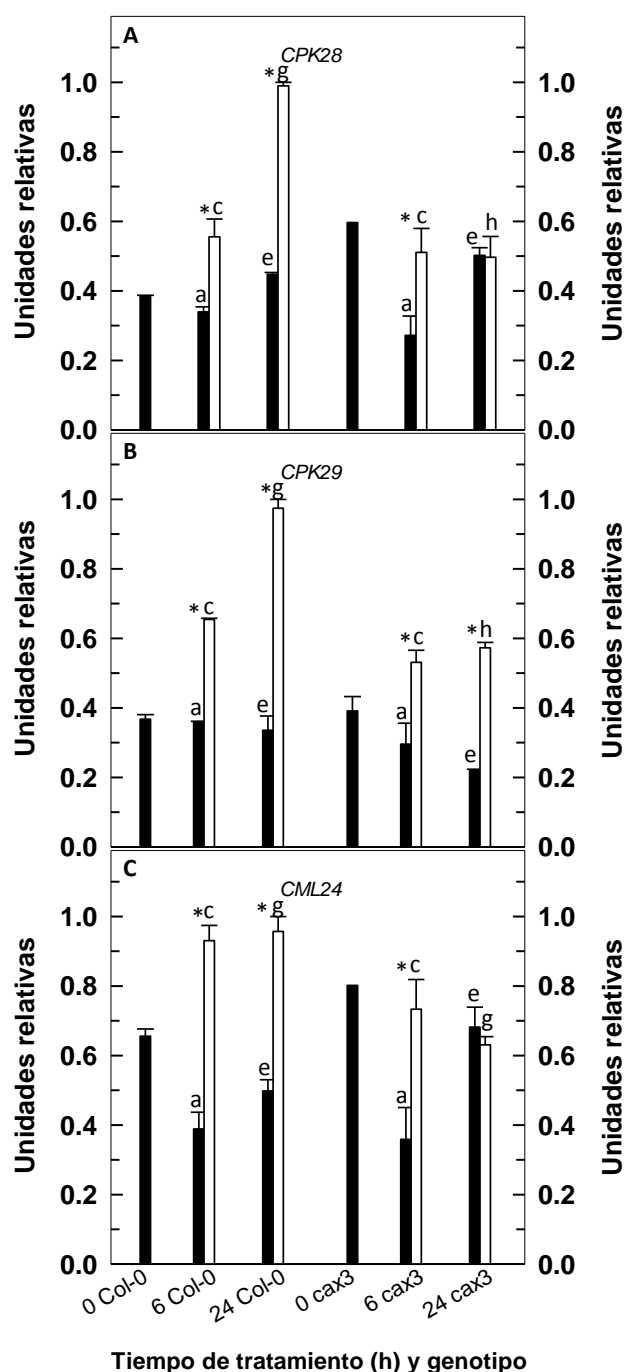


Figura 17. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CPK28* (A), *CPK29* (B) y *CML24* (C) en las raíces de arábidopsis de los genotipos silvestre y mutante *cax3* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.3.2. Genes relacionados con el transporte de boro

Se analizó también la expresión de los transportadores de B *BOR1* y *NIP5;1* (Figura 18). Ambos genes se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de deficiencia en B en el genotipo silvestre. Aunque *NIP5;1* se sobreexpresó a las 6 y 24 h de déficit de B en *cax3*, *BOR1* solo se sobreexpresó significativamente tras 6 h de tratamiento en el genotipo mutante (Figura 18A,B). Además, la expresión de *BOR1* fue notablemente menor en *cax3* a las 24 h bajo limitación de B con respecto a la del silvestre (Figura 18A).

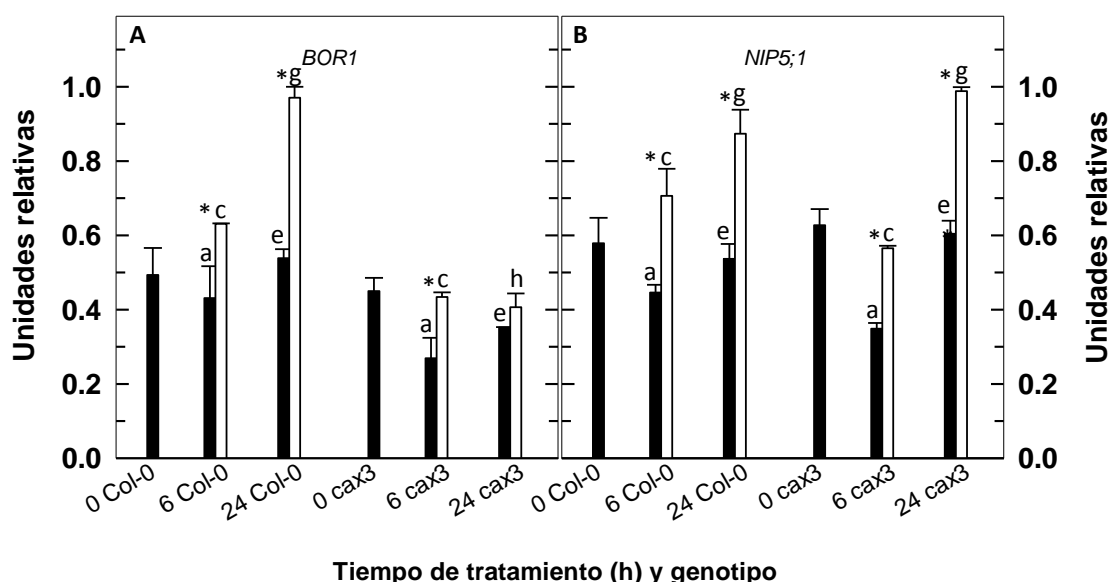


Figura 18. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *BOR1* (A) y *NIP5;1* (B) en las raíces de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre y mutante *cax3* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.3.3. Genes relacionados con el transporte de potasio

El análisis de expresión del transportador de potasio *AKT1* mostró que este gen no se vio afectado por la deficiencia de B en ninguno de los dos genotipos (**Figura 19A**). Por su parte, el gen *HAK5* se sobreexpresó tras 6 y 24 h de ausencia de B en Col-0 y *cax3* (**Figura 19B**). Finalmente, el gen *SKOR* se sobreexpresó tras 6 y 24 h de déficit de B en el genotipo mutante en comparación con el tratamiento de suficiencia, pero no en el silvestre (**Figura 19C**).

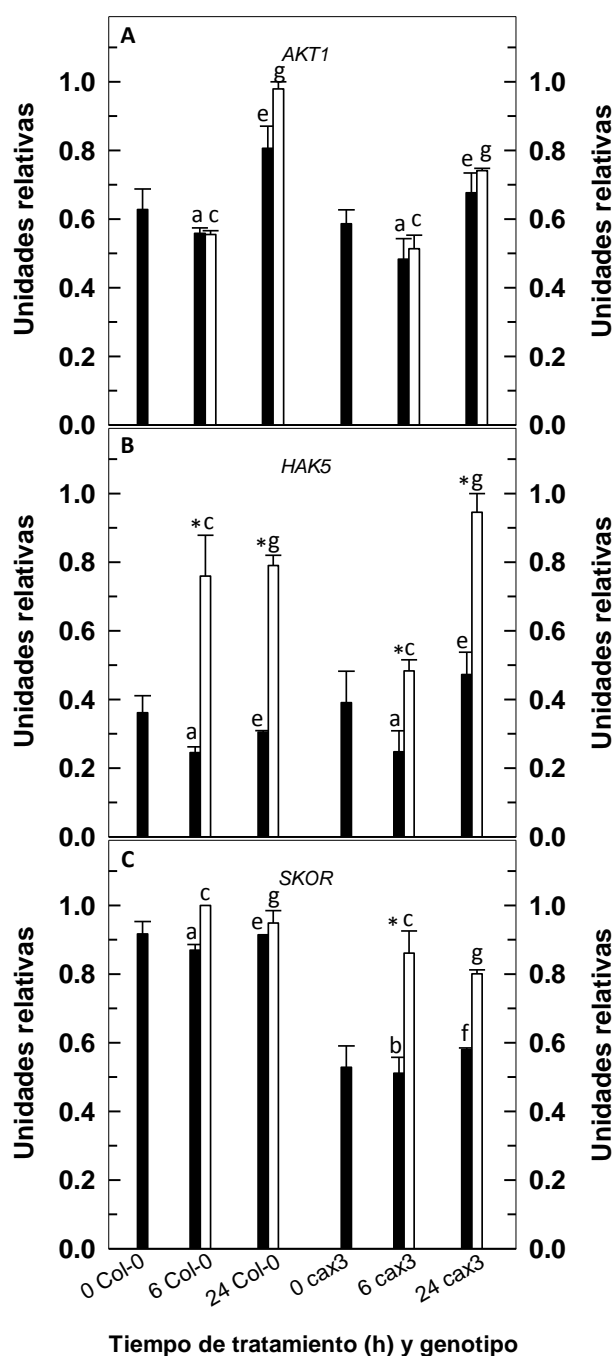


Figura 19. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *AKT1* (A), *HAK5* (B) y *SKOR* (C) en las raíces de arabisopsis de los genotipos silvestre y mutante *cax3* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.3.4. Genes que codifican factores de transcripción

Por último, se estudió el efecto de la deficiencia de B sobre los factores de transcripción *bZIP34*, *GATA4*, *MYB15* y *WRKY46* (**Figura 20**). *bZIP34* se reprimió tras 24 h de deficiencia en B en ambos genotipos (**Figura 20A**). El gen *GATA4* tuvo una menor expresión tras 6 y 24 h de déficit de B en Col-0 y *cax3*, y la expresión a las 24 h fue significativamente menor en el mutante en ambos tratamientos (**Figura 20B**). Tanto *MYB15* como *WRKY46* se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de deficiencia en B en los dos genotipos (**Figura 20C,D**); en ambos casos, la expresión fue mayor en Col-0 que en *cax3* tras 24 h de tratamiento con déficit de B.

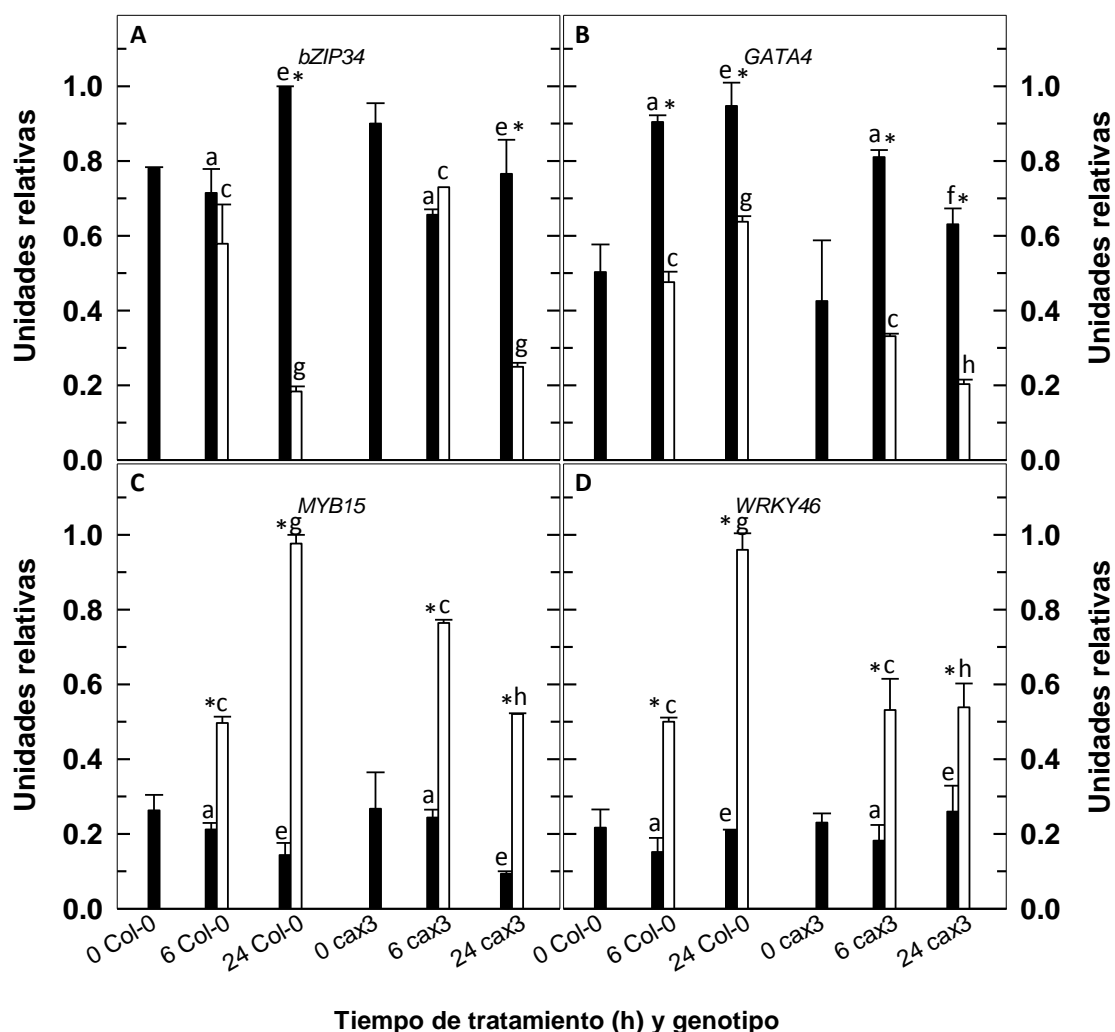


Figura 20. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *bZIP34* (A), *GATA4* (B), *MYB15* (C) y *WRKY46* (D) en las raíces de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre y mutante *cax3* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.4. Análisis de la expresión génica en el mutante *cngc19* mediante Q-RT-PCR

Al igual que se hizo para el gen *CAX3*, se emplearon líneas homocigóticas insercionales para el gen *CNGC19*. Así, se pudo estudiar la expresión diferencial de ciertos genes afectados por la deficiencia en B en las raíces del mutante *cngc19*, en comparación con el genotipo silvestre Col-0, tras 6 y 24 h de déficit de B.

III.1.4.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}

En la **Figura 21** se muestra la expresión de los genes *ACA10* y *CAX3*. Ambos se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de deficiencia en B tanto en el genotipo silvestre como en el mutante *cngc19* (**Figura 21A,B**), si bien no se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos.

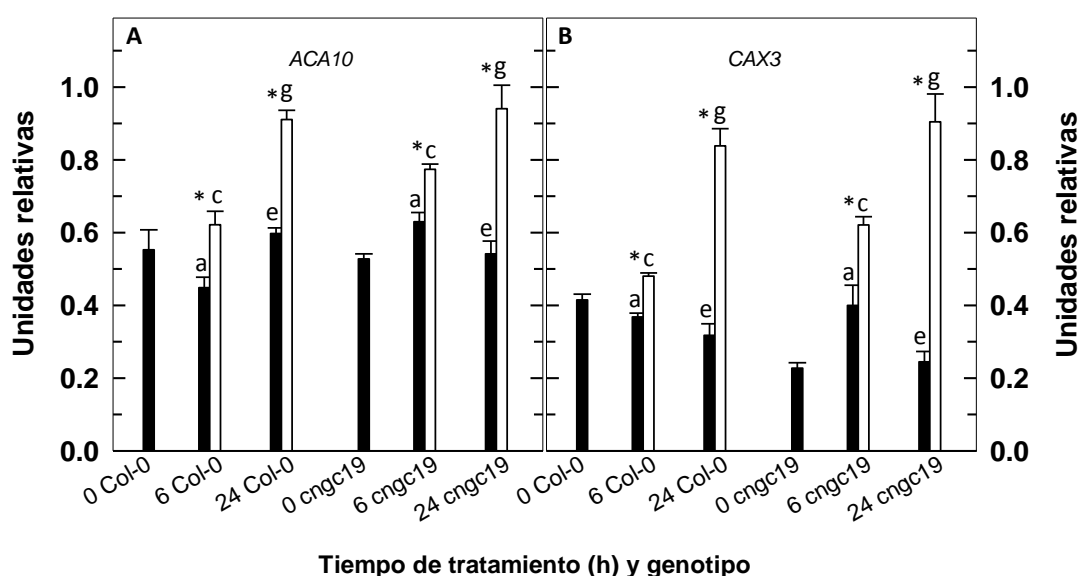


Figura 21. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *ACA10* (A) y *CAX3* (B) en las raíces de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre y mutante *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

En la **Figura 22** se muestra la expresión de los genes *CBL1*, *CBL4*, *CBL9* y *CIPK23*. El gen *CBL1* se sobreexpresó tras 24 h de tratamiento con déficit de B, tanto en el genotipo silvestre como en el mutante, mientras que *CBL4* se sobreexpresó tras 6 y 24 h de deficiencia en B en ambos genotipos (**Figura 22A,B**). En el caso de *CBL9*, este gen se reprimió significativamente tras 24 h de ausencia de B en Col-0, pero no en el mutante *cngc19* (**Figura 22C**). Finalmente, el gen *CIPK23* se sobreexpresó tras 24 h de deficiencia en B en el genotipo mutante, pero no en el silvestre (**Figura 22D**).

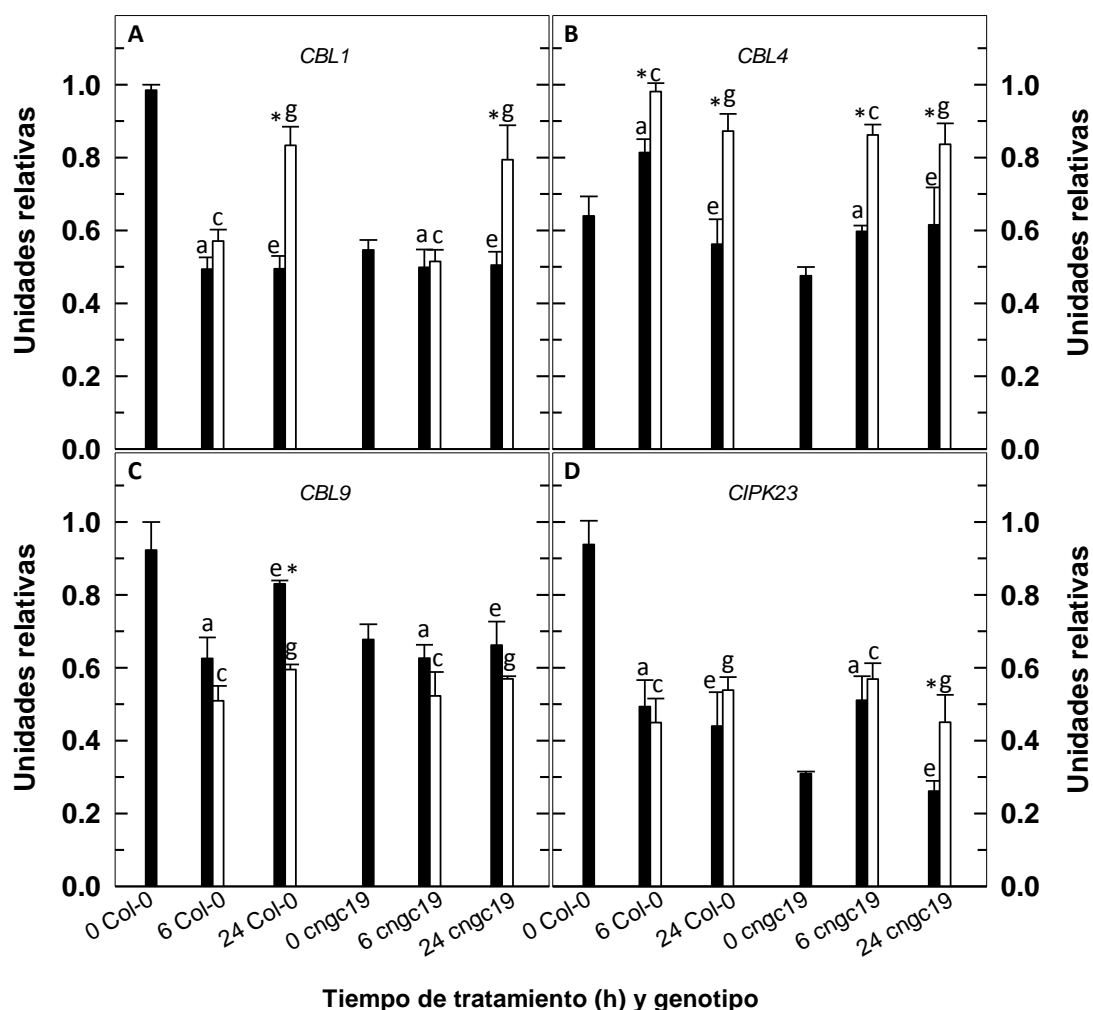


Figura 22. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CBL1* (A), *CBL4* (B), *CBL9* (C) y *CIPK23* (D) en las raíces de arabisopsis de los genotipos silvestre y mutante *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

En la **Figura 23** se incluye la expresión de los genes *CPK28*, *CPK29* y *CML24*. El gen *CPK28* se sobreexpresó a las 6 y 24 h de deficiencia en B en Col-0, pero en el genotipo mutante solo se sobreexpresó tras 24 h (**Figura 23A**). Los genes *CPK29* y *CML24* tuvieron mayores niveles de transcritos tanto a las 6 como a las 24 h de deficiencia de B en ambos genotipos (**Figura 23B,C**). La expresión de estos genes no tuvo diferencias significativas entre los genotipos silvestre y mutante.

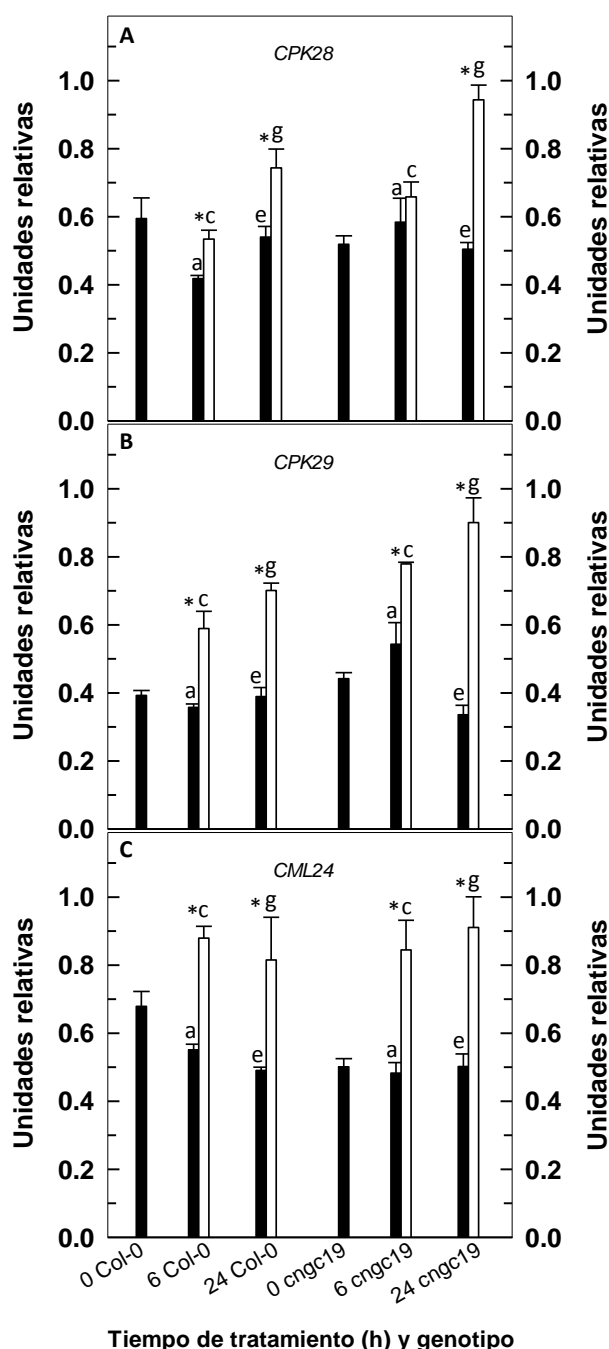


Figura 23. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CPK28* (A), *CPK29* (B) y *CML24* (C) en las raíces de arabisopsis de los genotipos silvestre y mutante *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.4.2. Genes relacionados con el transporte de boro

Se analizó también la expresión de los transportadores de B *BOR1* y *NIP5;1*. Ambos se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de deficiencia de B en los dos genotipos en comparación con el tratamiento de suficiencia (**Figura 24A,B**), aunque no hubo diferencias significativas entre ambos genotipos.

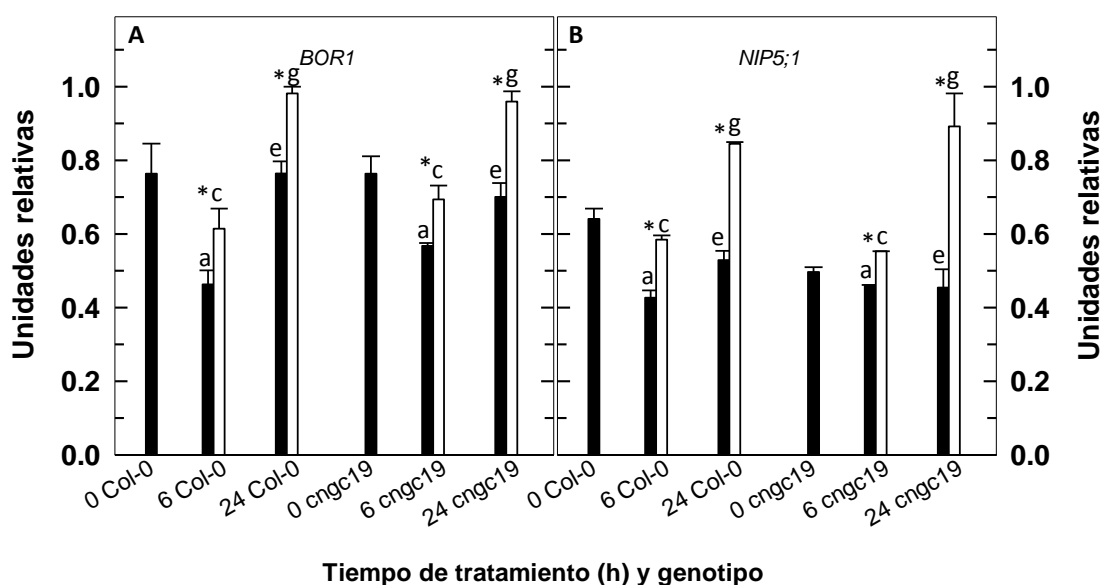


Figura 24. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *BOR1* (A) y *NIP5;1* (B) en las raíces de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre y mutante *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.4.3. Genes relacionados con el transporte de potasio

El análisis de expresión de los transportadores de potasio *AKT1*, *HAK5* y *SKOR* se indica en la **Figura 25**. El gen *AKT1* no se vio afectado por la deficiencia de B en el genotipo silvestre, pero se sobreexpresó tras 24 h de tratamiento con déficit de B en *cngc19* (**Figura 25A**). Interesantemente, el gen *HAK5* fue el único de este grupo que tuvo una mayor expresión tras 6 y 24 h de deficiencia en B, tanto en el genotipo Col-0 como en el *cngc19* (**Figura 25B**). No se encontraron diferencias significativas en las expresiones de los genes *AKT1* y *HAK5* entre ambos genotipos. Finalmente, *SKOR* no se afectó por la deficiencia de B en ninguno de los genotipos; además, a las 24 h, la expresión de *SKOR* en el mutante fue significativamente menor que la del silvestre en ambos tratamientos (**Figura 25C**).

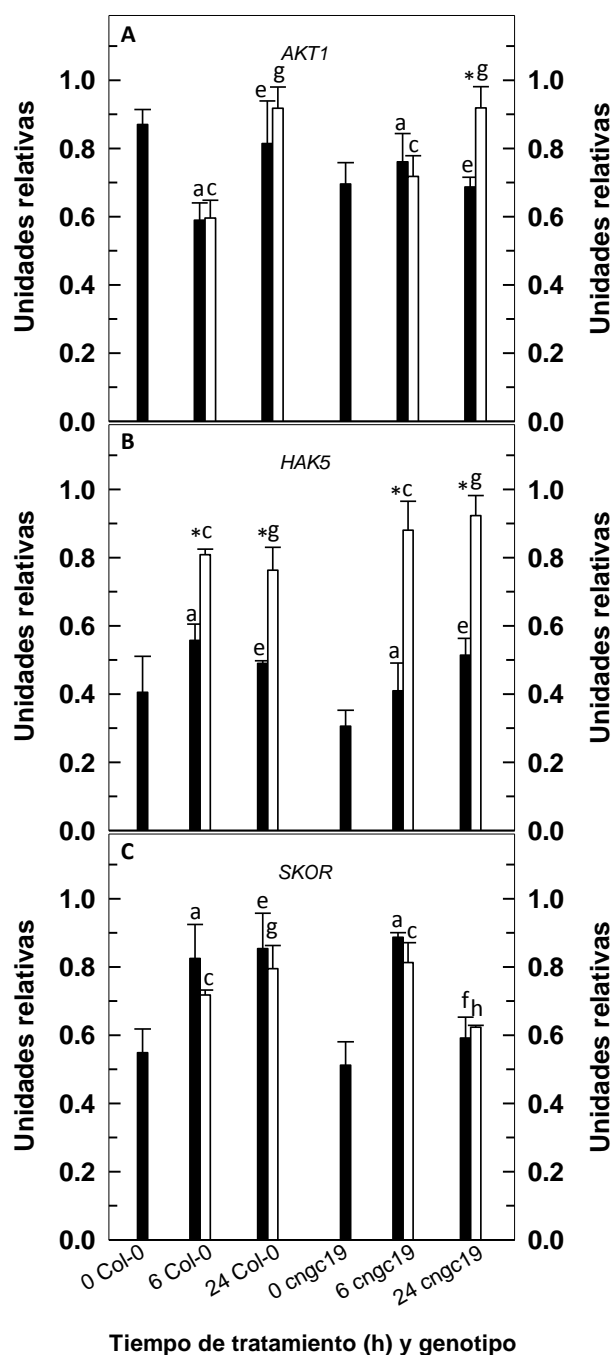


Figura 25. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *AKT1* (A), *HAK5* (B) y *SKOR* (C) en las raíces de arabidopsis de los genotipos silvestre y mutante *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.4.4. Genes que codifican factores de transcripción

Por último, se estudió el efecto de la deficiencia de B sobre la expresión de los factores de transcripción *bZIP34*, *GATA4*, *MYB15* y *WRKY46* (**Figura 26**). El gen *bZIP34* se reprimió tras 24 h de deficiencia en B en ambos genotipos (**Figura 26A**). *GATA4* tuvo una menor expresión tras 6 y 24 h de déficit de B en Col-0 y *cngc19* (**Figura 26B**). Tanto *MYB15* como *WRKY46* se sobreexpresaron a las 6 y 24 h de deficiencia en B en los dos genotipos (**Figura 26C,D**). En ninguno de estos genes se observó una expresión diferencial al comparar ambos genotipos.

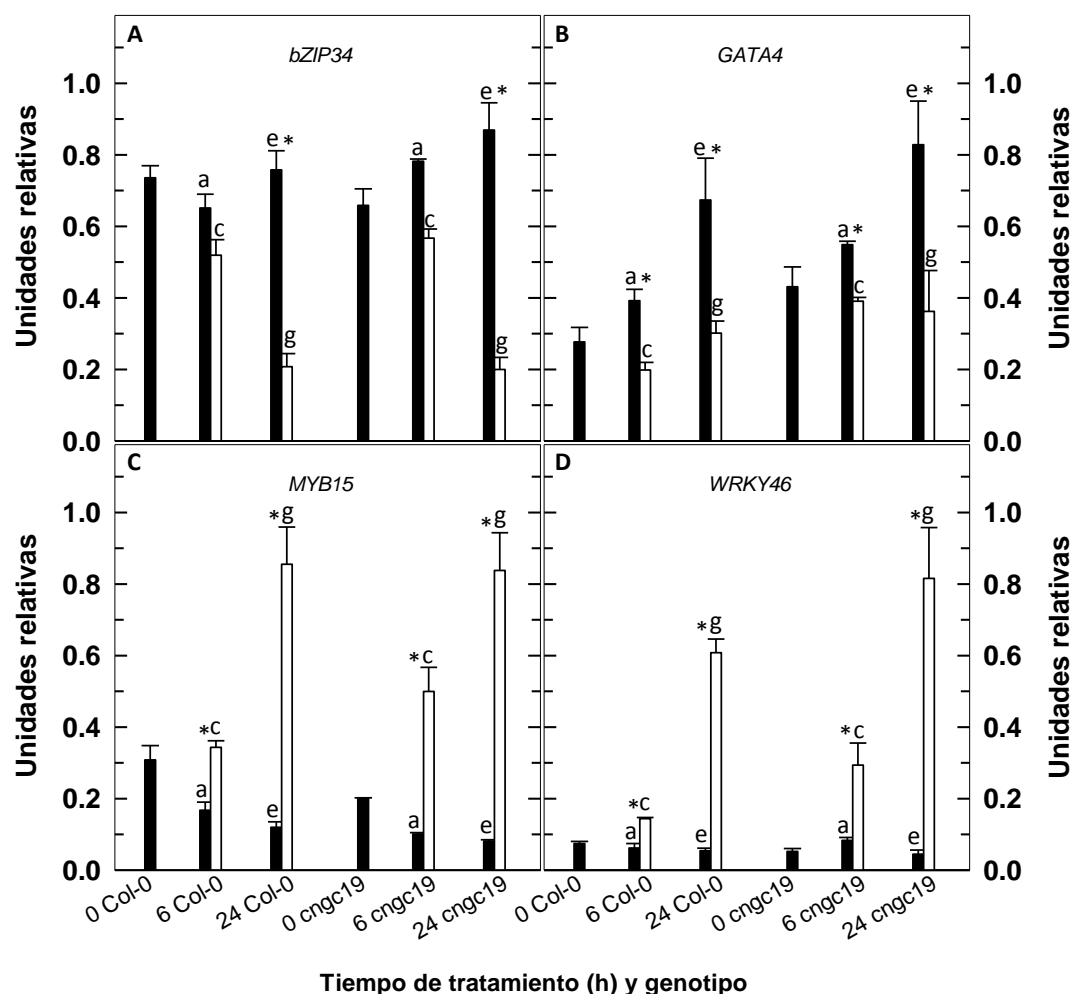


Figura 26. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *bZIP34* (A), *GATA4* (B), *MYB15* (C) y *WRKY46* (D) en las raíces de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre y mutante *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor < 0,05) entre ambos genotipos a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.5. Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de EGTA

En este apartado se empleó el quelante de Ca^{2+} EGTA puesto que puede afectar a la disponibilidad de Ca^{2+} extracelular. De este modo se pretendió estudiar si la alteración de los niveles de Ca^{2+} modificaría el patrón de expresión de ciertos genes afectados por la deficiencia de B. La concentración de EGTA fue 1 mM; estos análisis se realizaron en las raíces del genotipo Col-0 tras 6 y 24 h déficit de B y mediante la técnica Q-RT-PCR.

III.1.5.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}

En la **Figura 27** se muestra el análisis de la expresión de los genes *ACA10*, *CAX3*, *CNGC19*, *CML24*, *CPK28* y *CPK29*. En ausencia de EGTA la expresión de estos genes fue mayor en deficiencia de B, tanto a las 6 como a las 24 h, en comparación con el tratamiento de B. En general, el aporte de EGTA causó una mayor expresión génica. Exceptuando el gen *CPK28*, en el que el EGTA no causó un efecto significativo (**Figura 27E**), *CNGC19* fue el único gen que tuvo diferencias significativas entre los tratamientos de B a las 24 h en presencia de EGTA (**Figura 27C**); es decir, la adición de EGTA eliminó las diferencias de expresión entre los tratamientos de B en los genes *ACA10*, *CAX3*, *CML24* y *CPK29* (**Figura 27A,B,D,F**).

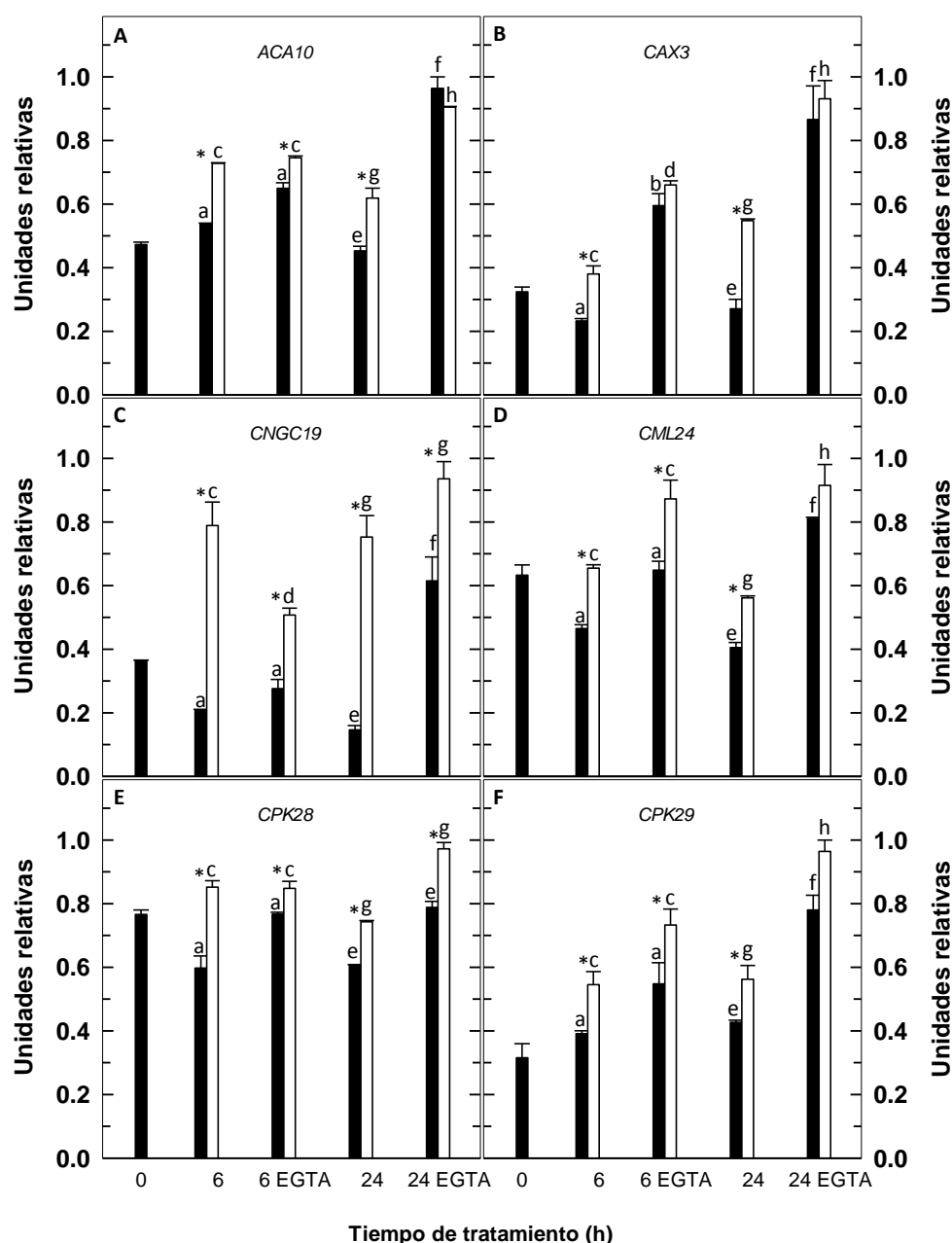


Figura 27. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *ACA10* (A), *CAX3* (B), *CNGC19* (C), *CML24* (D), *CPK28* (E) y *CPK29* (F) en las raíces de plantas de arabis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de EGTA 1 mM. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos con y sin EGTA a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

La expresión de los genes *CBL1*, *CBL4* y *CBL9* se recoge en la **Figura 28**. Como se ha mostrado anteriormente (**Figura 9A,C,D**), en general los genes *CBL1* y *CBL4* se sobreexpresaron en deficiencia de B (**Figura 28A,B**), mientras que el gen *CBL9* se reprimió (**Figura 28C**). La presencia de EGTA provocó a las 6 h una mayor expresión del gen *CBL1* en ausencia de B (**Figura 28A**). Además, la adición de este quelante a las 24 h igualó las expresiones de los genes *CBL4* y *CBL9* en ambos tratamientos de B (**Figura 28B,C**).

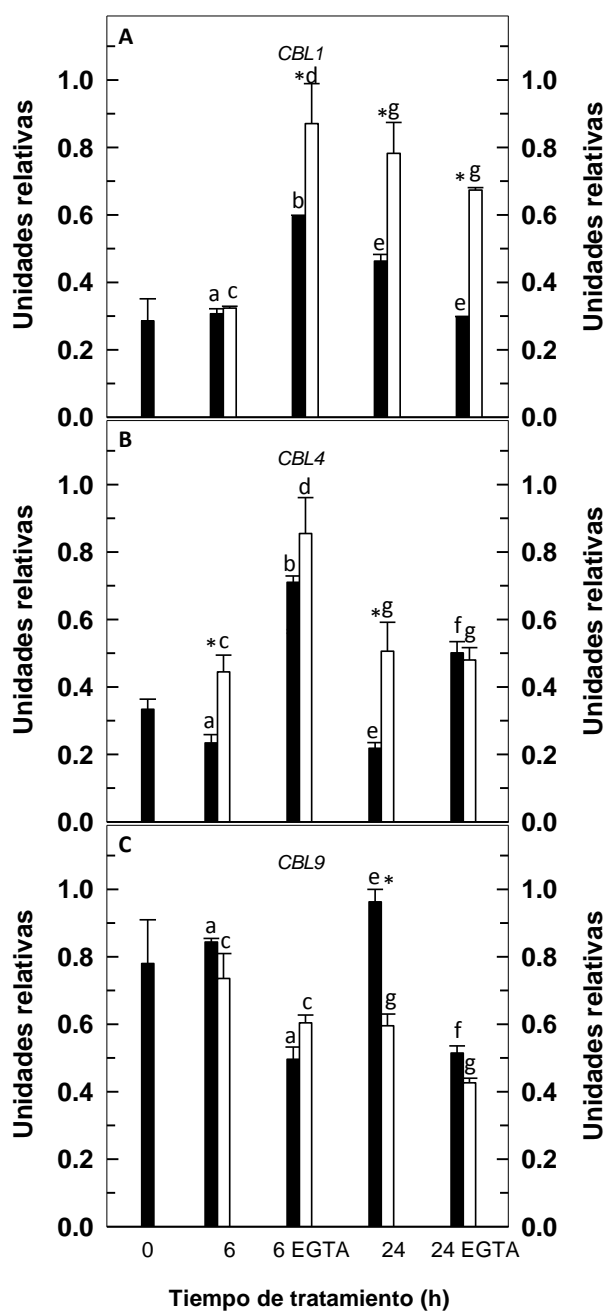


Figura 28. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CBL1* (A), *CBL4* (B) y *CBL9* (C) en las raíces de plantas de *arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de EGTA 1 mM. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos con y sin EGTA a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.5.2. Genes que codifican factores de transcripción

Por último, se analizó la expresión de distintos genes involucrados en la síntesis de factores de transcripción. El gen *bZIP34* se reprimió tras 24 h de tratamiento con deficiencia de B, tanto en ausencia como en presencia de EGTA; es de destacar que este compuesto redujo notablemente la expresión de *bZIP34* a las 6 y 24 h de tratamiento (**Figura 29A**). *GATA4* tuvo un comportamiento similar al del gen *bZIP34*, pero con resultados menos acusados (**Figura 29B**). Por otra parte, *MYB15* y *WRKY46* se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de deficiencia de B en ausencia y en presencia de EGTA; además, este quelante aumentó considerablemente la expresión de estos genes a las 6 y 24 h, tanto en condiciones de suficiencia como de deficiencia de B (**Figura 29C,D**).

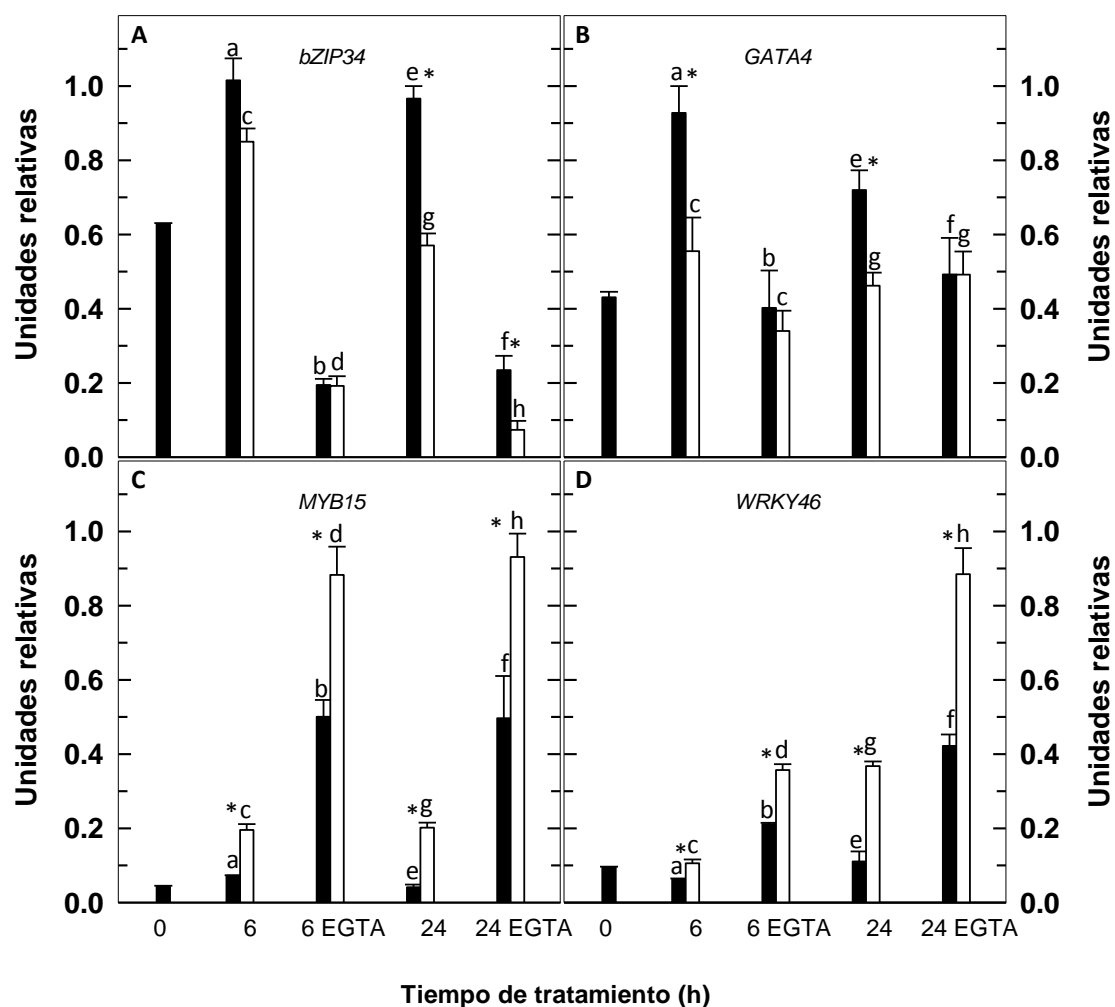


Figura 29. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *bZIP34* (A), *GATA4* (B), *MYB15* (C) y *WRKY46* (D) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de EGTA 1 mM. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos con y sin EGTA a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.6. Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de ABA

Dado que el ABA es una fitohormona que altera los niveles de Ca^{2+} citosólico, se estudió empleando la técnica Q-RT-PCR el efecto del ABA, a una concentración de 5 μM , sobre la expresión de los genes analizados en el apartado anterior en las raíces del genotipo silvestre Col-0. Puesto que el ABA se tuvo que disolver en metanol, se incluyeron los respectivos controles.

III.1.6.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}

En la **Figura 30** se recoge el análisis de la expresión de los genes *ACA10*, *CAX3*, *CNGC19*, *CML24*, *CPK28* y *CPK29*. Todos los genes se sobreexpresaron tras 24 h de deficiencia en B, tanto en ausencia como en presencia de metanol o ABA. Además, hay que destacar que la presencia de ABA aumentó de forma notable la expresión del gen *CAX3*, tanto en suficiencia como en deficiencia de B (**Figura 30B**).

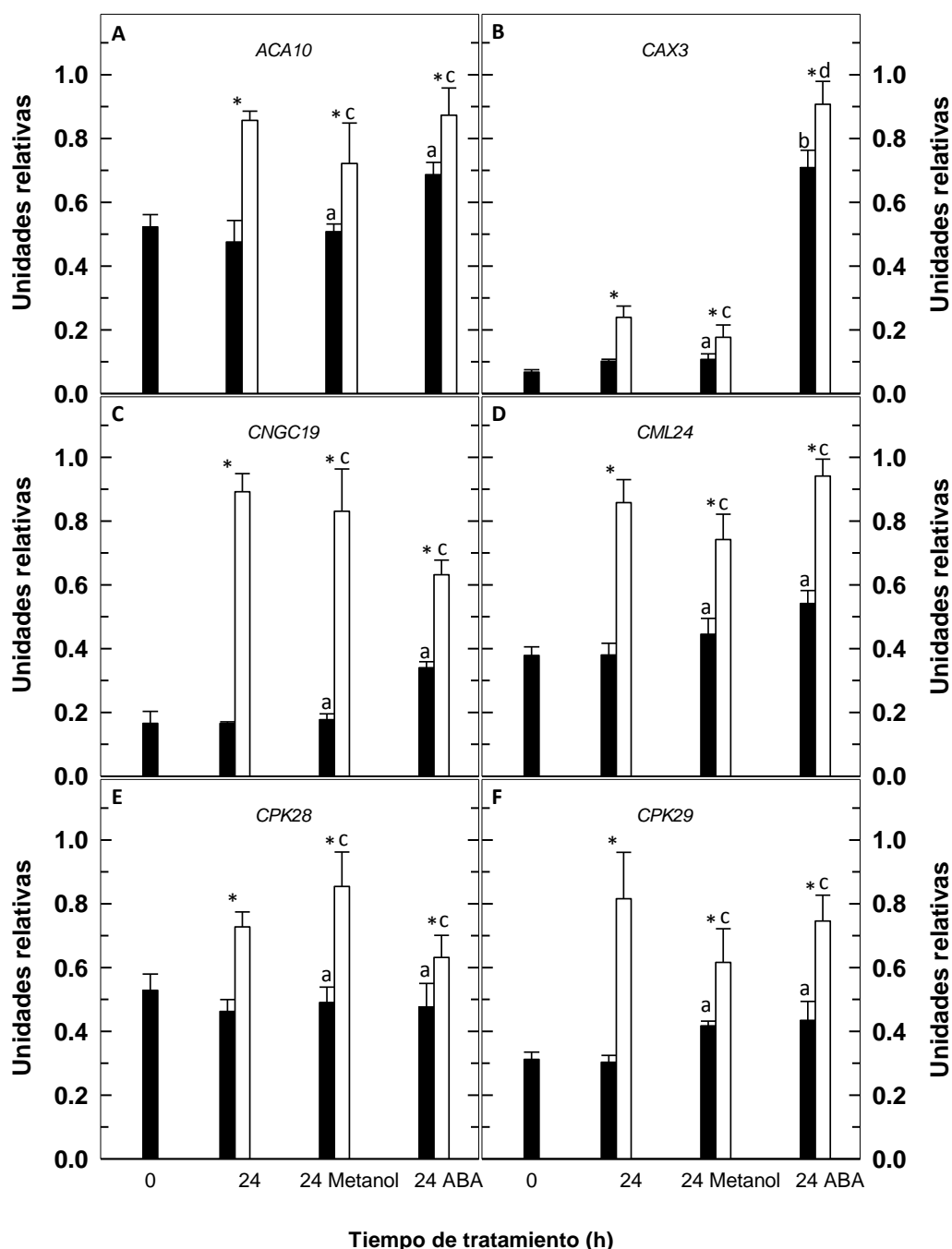


Figura 30. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *ACA10* (A), *CAX3* (B), *CNGC19* (C), *CML24* (D), *CPK28* (E) y *CPK29* (F) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h, en presencia o no de metanol o ABA 5 μ M. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor < 0,05) entre los tratamientos con y sin ABA (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 24 h en deficiencia).

La expresión de los genes *CBL1*, *CBL4* y *CBL9* se muestra en la **Figura 31**. El gen *CBL1* se sobreexpresó tras 24 h de deficiencia de B y, mientras que la presencia de metanol no alteró este efecto, sí lo hizo el ABA, que aumentó la expresión de este gen en presencia de B (**Figura 31A**). En el caso de *CBL4*, este gen se sobreexpresó tras 24 h de déficit de B, pero tanto el metanol como el ABA eliminaron este efecto (**Figura 31B**). Por último, el gen *CBL9* se reprimió tras 24 h de deficiencia de B y, de nuevo, la presencia de metanol no alteró este efecto, pero sí la de ABA, que incrementó la expresión de este gen en deficiencia de B (**Figura 31C**).

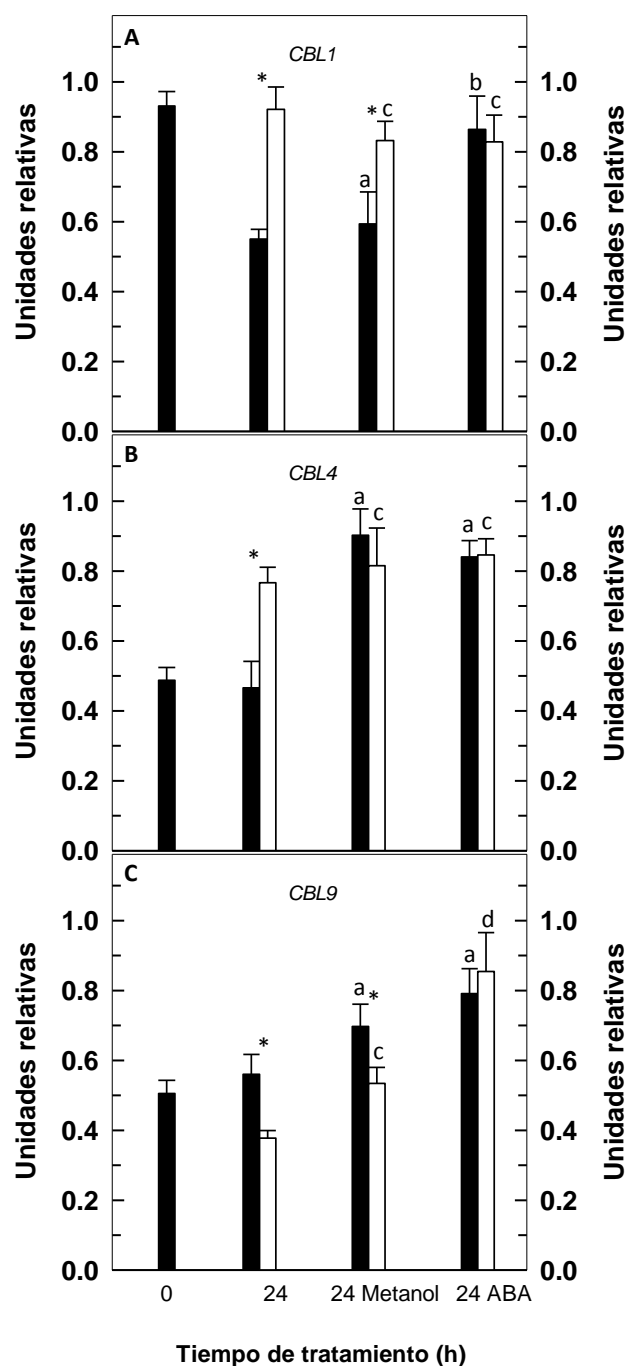


Figura 31. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CBL1* (A), *CBL4* (B) y *CBL9* (C) en las raíces de plantas de *arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h, en presencia o no de metanol o ABA 5 μ M. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos con y sin ABA (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.6.2. Genes que codifican factores de transcripción

Finalmente, se analizó la expresión de los genes *bZIP34*, *GATA4*, *MYB15* y *WRKY46* (**Figura 32**). El gen *bZIP34* se reprimió tras 24 h de tratamiento con deficiencia de B, tanto en ausencia como en presencia de metanol o ABA, y este último redujo la expresión en condiciones de suficiencia de B (**Figura 32A**). La expresión de *GATA4* se reprimió tras 24 h de déficit de B, tanto en ausencia como en presencia de metanol; sin embargo, el ABA causó una reversión de este efecto, ya que tras 24 h de tratamiento con esta hormona *GATA4* se sobreexpresó en deficiencia de B (**Figura 32B**). *MYB15* y *WRKY46* se sobreexpresaron tras 24 h de tratamiento con déficit de B, tanto en ausencia como en presencia de metanol o ABA (**Figura 32C,D**).

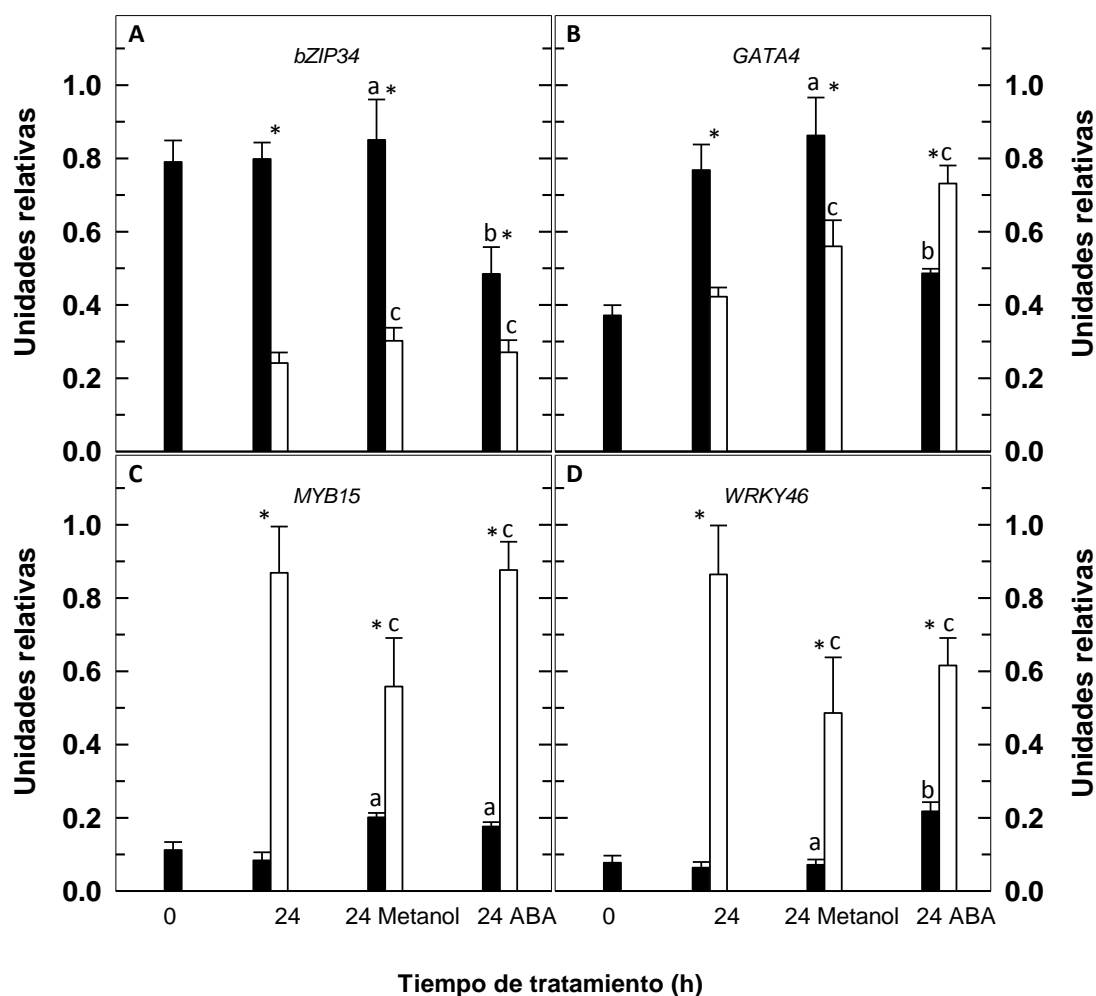


Figura 32. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *bZIP34* (A), *GATA4* (B), *MYB15* (C) y *WRKY46* (D) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h, en presencia o no de metanol o ABA 5 μ M. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor < 0,05) entre los tratamientos con y sin ABA (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.7. Análisis de la expresión génica en el genotipo silvestre en presencia de U73122

Debido a que el U73122 altera la señal de Ca^{2+} citosólico al bloquear la liberación de este catión desde reservorios intracelulares, se estudió empleando la técnica Q-RT-PCR el efecto del U73122, a una concentración de 5 μM , sobre la expresión de los genes analizados en el **apartado III.1.5** en las raíces del genotipo silvestre Col-0. Dado que el compuesto U73122 se tuvo que disolver en DMSO, se incluyeron los respectivos controles.

III.1.7.1. Genes relacionados con la señalización de Ca^{2+}

En la **Figura 33** se muestra el análisis de la expresión de los genes *ACA10*, *CAX3*, *CNGC19*, *CML24*, *CPK28* y *CPK29*. Todos los genes se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de tratamiento con deficiencia de B, tanto en ausencia como en presencia de DMSO; este efecto desapareció por la adición de U73122. Además, este compuesto aumentó la expresión de todos los genes tras 6 y 24 h, tanto en suficiencia como en deficiencia de B.

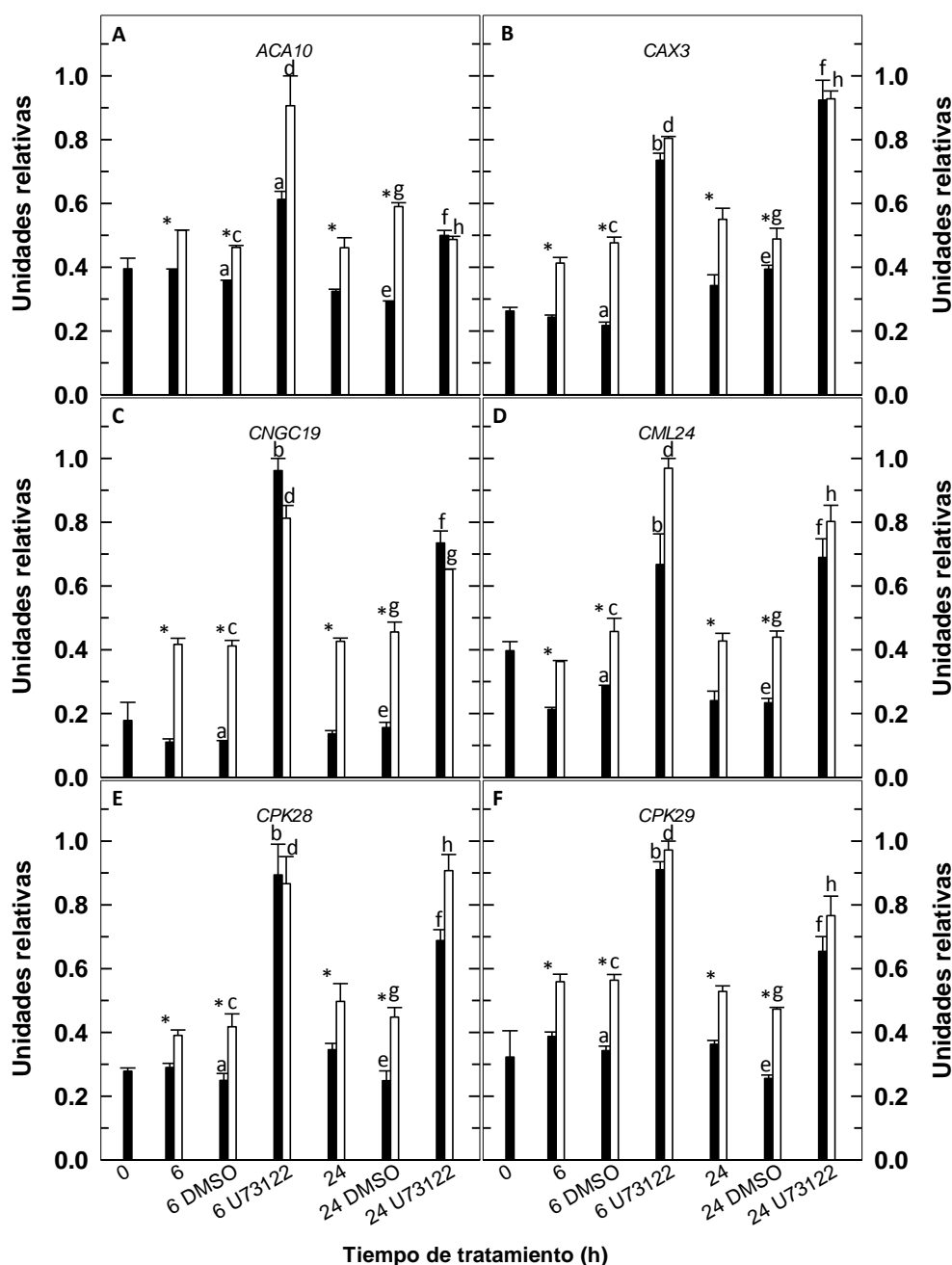


Figura 33. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *ACA10* (A), *CAX3* (B), *CNGC19* (C), *CML24* (D), *CPK28* (E) y *CPK29* (F) en las raíces de plantas de arabisopsis sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de DMSO o U73122 5 μ M. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos con y sin U73122 a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

La expresión de los genes *CBL1*, *CBL4* y *CBL9* se muestra en la **Figura 34**. El gen *CBL1* se sobreexpresó tras 24 h de tratamiento con deficiencia de B, tanto en ausencia como en presencia de DMSO o U73122; la adición de este último provocó un aumento de la expresión tras 6 h de tratamiento con independencia del aporte de B (**Figura 34A**). *CBL4* se sobreexpresó tras 6 y 24 h con déficit de B, tanto en ausencia como en presencia de DMSO, pero el compuesto U73122 eliminó este efecto pues disminuyó su expresión en condición de B limitante (**Figura 34B**). Finalmente, la expresión de *CBL9* se reprimió tras 24 h de deficiencia de B, en ausencia y presencia de DMSO, pero no de forma significativa tras la adición de U73122 (**Figura 34C**).

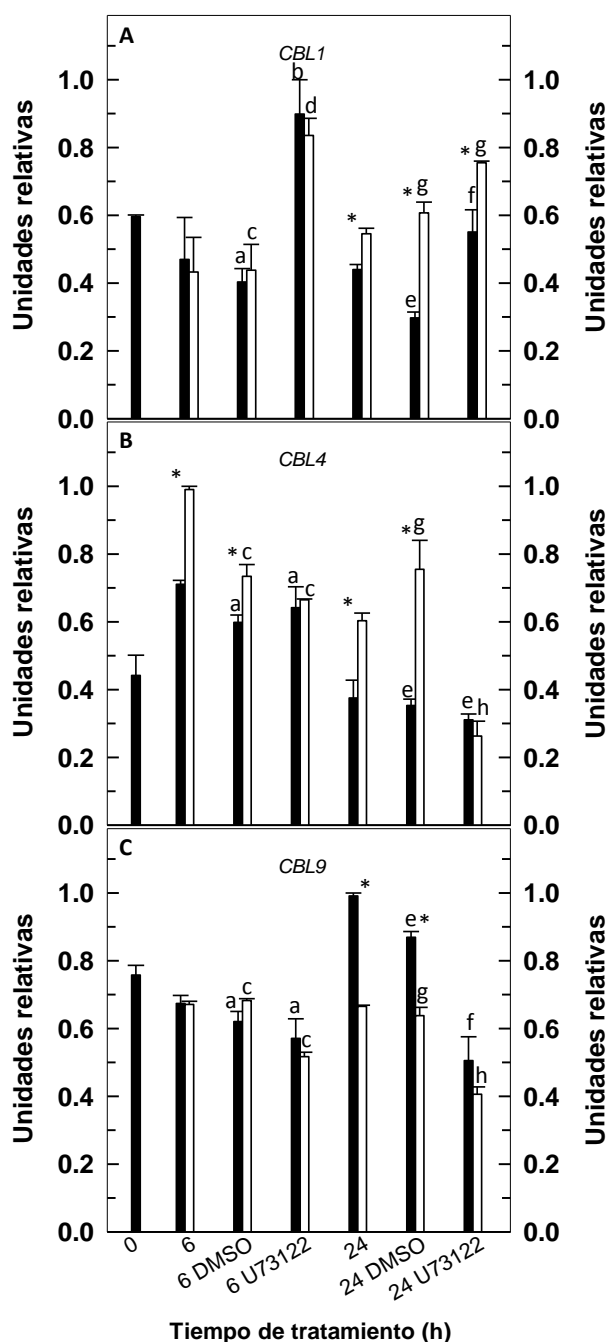


Figura 34. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *CBL1* (A), *CBL4* (B) y *CBL9* (C) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de DMSO o U73122 5 μ M. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos con y sin U73122 a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.7.2. Genes que codifican factores de transcripción

Se analizó la expresión de los genes *bZIP34*, *GATA4*, *MYB15* y *WRKY46* (**Figura 35**). El gen *bZIP34* se reprimió tras 24 h de déficit de B, tanto en ausencia como en presencia de DMSO o U73122, así como tras 6 h de tratamiento con U73122. Además, este compuesto provocó una marcada reducción de la expresión del gen tras 6 y 24 h en suficiencia y deficiencia de B (**Figura 35A**). En cuanto a *GATA4*, aunque su expresión se reprimió tras 6 y 24 h de deficiencia en B, la presencia de DMSO eliminó este efecto tanto a las 6 como a las 24 h de tratamiento; sin embargo, el compuesto U73122 provocó su sobreexpresión tras 6 h, pero no tras 24 h (**Figura 35B**). Finalmente, *MYB15* y *WRKY46* se sobreexpresaron tras 6 y 24 h de déficit de B en ausencia o presencia de DMSO; este efecto se alteró por la adición de U73122, el cual aumentó considerablemente la expresión de ambos genes, a las 6 y a las 24 h de tratamiento, tanto en suficiencia como en deficiencia de B (**Figura 35C,D**). La adición de este compuesto anuló las diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes *MYB15* y *WRKY46* entre los tratamientos de B a las 24 h.

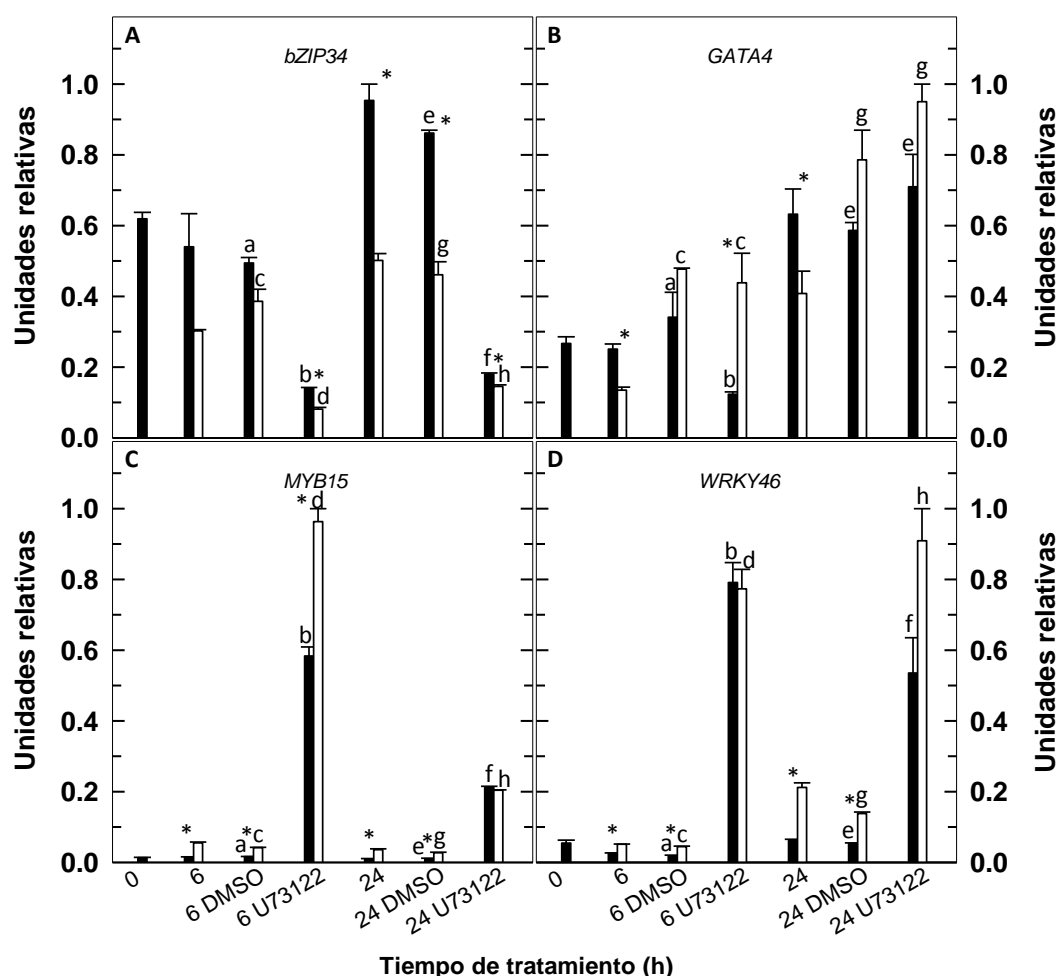


Figura 35. Análisis por Q-RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes *bZIP34* (A), *GATA4* (B), *MYB15* (C) y *WRKY46* (D) en las raíces de plantas de *Arabidopsis* sometidas (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 6 y 24 h, en presencia o no de DMSO o U73122 5 μ M. El aislamiento del RNA, la síntesis del cDNA y el análisis por Q-RT-PCR se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 14 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). En cada gen se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los tratamientos con y sin U73122 a los mismos tiempos (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 6 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 6 h en deficiencia; **e** y **f** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **g** y **h** para el de 24 h en deficiencia).

III.1.8. Análisis de la expresión de los promotores mediante el ensayo histoquímico de la enzima β -glucuronidasa

Para profundizar en el análisis del efecto de la deficiencia de B sobre la expresión de los genes *ACA10*, *CML12*, *CML24*, *CPK28* y *MYB15* en las raíces de *Arabidopsis*, se emplearon las líneas reporteras *pACA10::GUS*, *pCML12::GUS*, *pCML24::GUS*, *pCPK28::GUS* y *pMYB15::GUS*. Estas líneas fueron tratadas durante 24 h con los compuestos EGTA 1 mM, ABA 5 μ M, U73122 5 μ M o DPI 10 μ M en condiciones de suficiencia o deficiencia en B.

Línea *pACA10::GUS*

En condiciones de suficiencia de B se observó que la actividad de este promotor tuvo lugar mayoritariamente en la zona meristemática y ligeramente en el cilindro central. La deficiencia de B provocó una clara sobreexpresión tanto en el cilindro central como en la zona meristemática (**Figura 36B**).

En las plantas cultivadas con B, la adición de EGTA, ABA o U73122 aumentó ligeramente la expresión GUS bajo control del promotor *ACA10* en el cilindro central (**Figura 36A,C,E,G**). La presencia de DPI prácticamente no modificó la actividad de este promotor (**Figura 36A,I**).

En las plantas sometidas a deficiencia de B, la aplicación de EGTA o ABA apenas afectó a la expresión GUS (**Figura 36B,D,F**). Sin embargo, U73122 y, sobre todo, DPI disminuyeron la actividad de este promotor en el cilindro central (**Figura 36B,H,J**).

Si se comparan ambos tratamientos de B, la adición de EGTA o ABA incrementó la expresión GUS en el cilindro central en las plantas deficientes en B (**Figura 36C-F**).

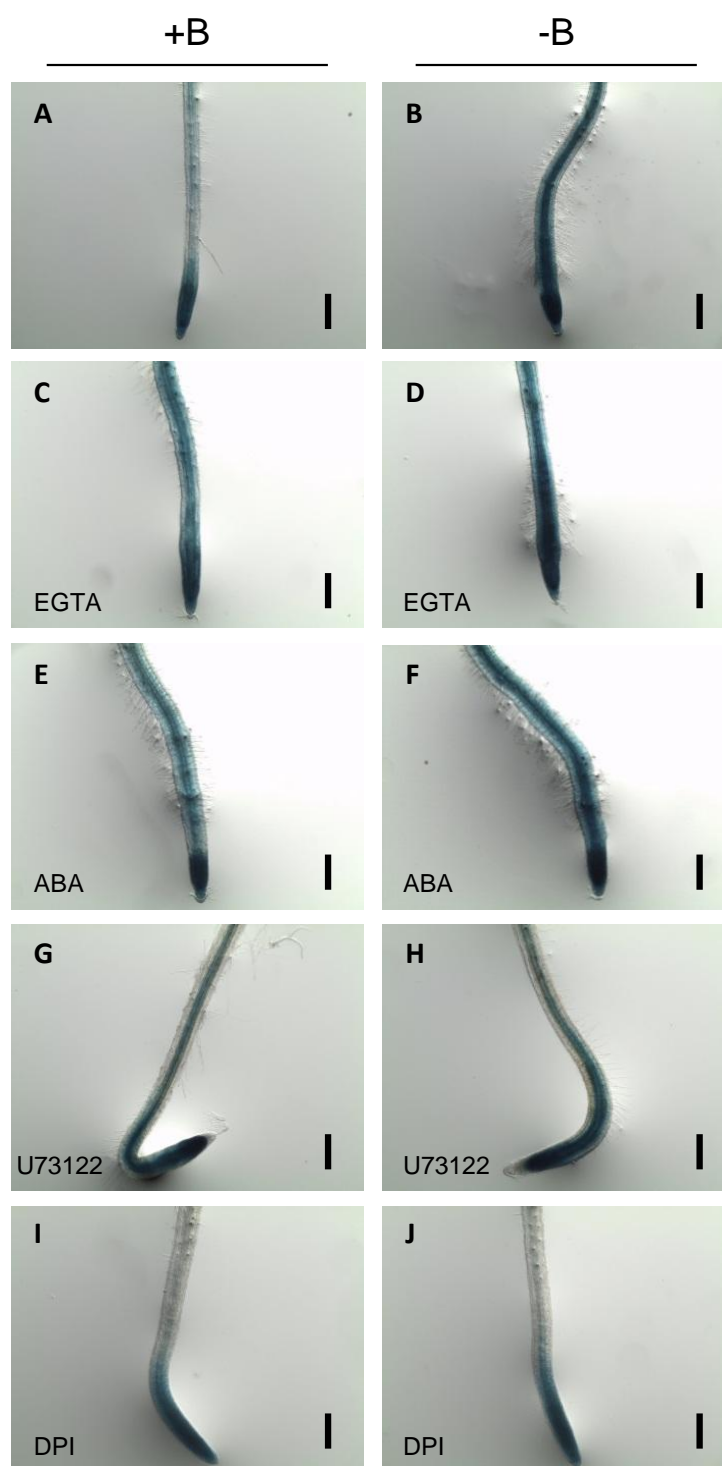


Figura 36. Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión GUS de la línea reportera pACA10::GUS en las raíces de arabidopsis. La actividad del promotor del gen *ACA10* fue analizada en plántulas tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G, I) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J) en presencia de EGTA 1 mM (C, D), ABA 5 μ M (E, F), U73122 5 μ M (G, H) o DPI 10 μ M (I, J). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes en los que se analizaron al menos 10 plántulas en cada uno. Escala: 200 μ m.

Línea pCML12::GUS

Los resultados obtenidos para esta línea se muestran en la **Figura 37**. Se detectó una leve señal de expresión en el cilindro central de las zonas de elongación y maduración en el tratamiento de suficiencia de B (**Figura 37A**), y una sobreexpresión tras 24 h de deficiencia en B (**Figura 37B**).

En las plantas con suficiencia de B la adición de U73122 o DPI provocó un notable aumento de la expresión GUS de *CML12* en la zona de elongación y al inicio del cilindro central (**Figura 37A,G,I**). Sin embargo, la aplicación de EGTA y, sobre todo, ABA apenas alteró su expresión (**Figura 37A,C,E**).

En las plantas con deficiencia de B, la adición de U73122, DPI y, especialmente, ABA disminuyó la actividad de este promotor en las zonas de elongación y maduración (cilindro central) (**Figura 37B,F,I**). Además, la presencia de U73122 redujo la expresión de este gen en la zona de maduración (cilindro central) (**Figura 37B,F,H,J**). En este tratamiento el quelante EGTA no modificó la expresión (**Figura 37B,D**).

Cuando se comparan los dos tratamientos de B, en las plantas con EGTA se observó una actividad similar a la de sus respectivos controles (**Figura 37A-D**). La presencia de ABA incrementó ligeramente la expresión GUS en el cilindro central (**Figura 37E,F**). Sin embargo, en las plantas tratadas con U73122 o DPI la disponibilidad de B no modificó la actividad de este promotor (**Figura 37G-J**).

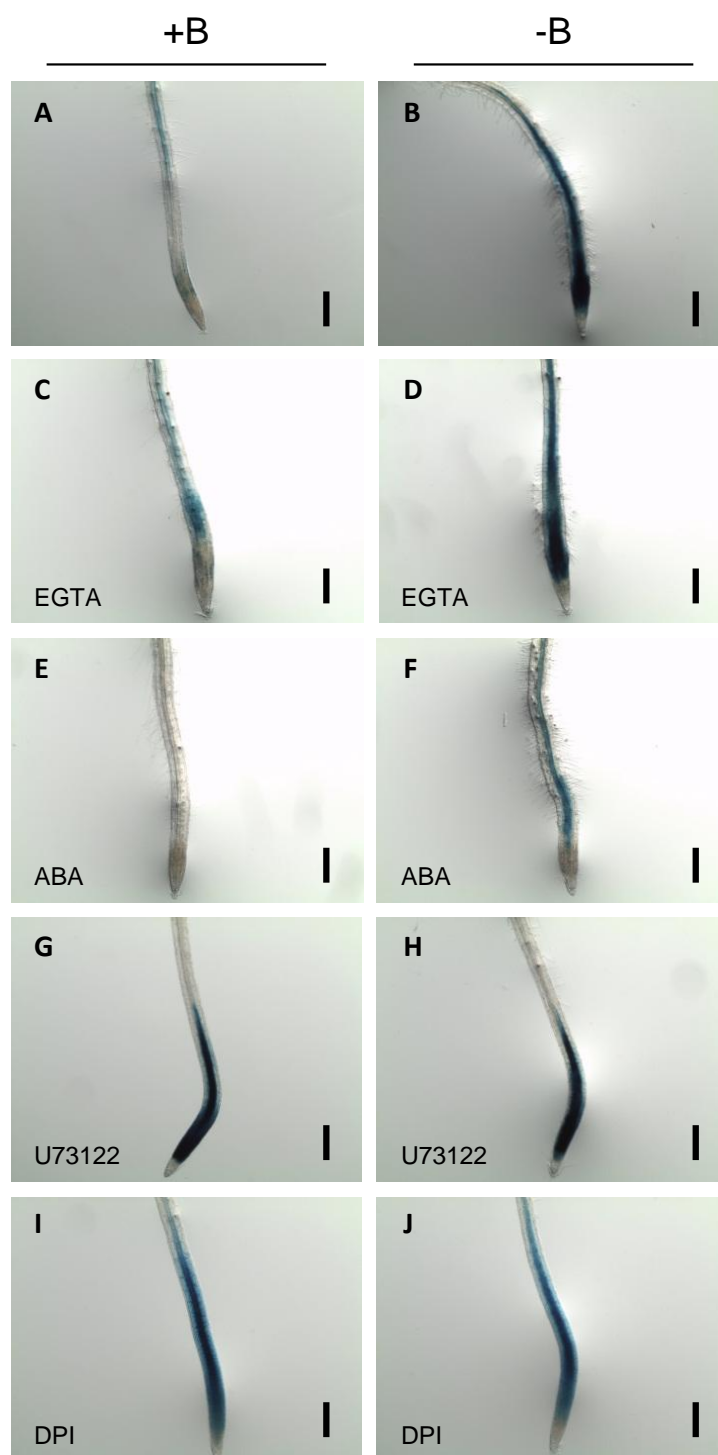


Figura 37. Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión GUS de la línea reportera pCML12::GUS en las raíces de *arabidopsis*. La actividad del promotor del gen *CML12* fue analizada en plántulas tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G, I) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J) en presencia de EGTA 1 mM (C, D), ABA 5 μ M (E, F), U73122 5 μ M (G, H) o DPI 10 μ M (I, J). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes en los que se analizaron al menos 10 plántulas en cada uno. Escala: 200 μ m.

Línea pCML24::GUS

Se detectó una leve expresión GUS en la zona de elongación y cilindro central en el tratamiento de suficiencia de B, y tras 24 h en deficiencia de B se sobreexpresó en las mismas localizaciones (**Figura 38A,B**).

En las plantas tratadas con B, la adición de EGTA, ABA o U73122 no varió la actividad del promotor (**Figura 38A,C,E,G**). Sin embargo, en presencia de DPI no se detectó expresión GUS (**Figura 38A,I**).

En las plantas con deficiencia de B, la aplicación de ABA o U73122 provocó una disminución de la expresión en las zonas de elongación y maduración (cilindro central) (**Figura 38B,F,H**). En presencia de DPI tampoco hubo expresión GUS (**Figura 38B,J**). Por el contrario, la adición de EGTA aumentó claramente la actividad de este promotor, sobre todo en el cilindro central de la zona de maduración (**Figura 38B,D**).

Si se comparan los dos tratamientos de B, en las plantas con EGTA la deficiencia de B incrementó la expresión GUS en las zonas de elongación y maduración (cilindro central) (**Figura 38C,D**). Sin embargo, la aplicación de ABA o U73122 aumentó ligeramente la expresión GUS; no obstante, mientras que con ABA este incremento se localizó en las zonas de elongación y maduración (cilindro central), con U73122 solo se observó en la zona de elongación (**Figura 38E-H**). Finalmente, en las plantas tratadas con DPI no se detectó actividad de este promotor (**Figura 38I,J**).

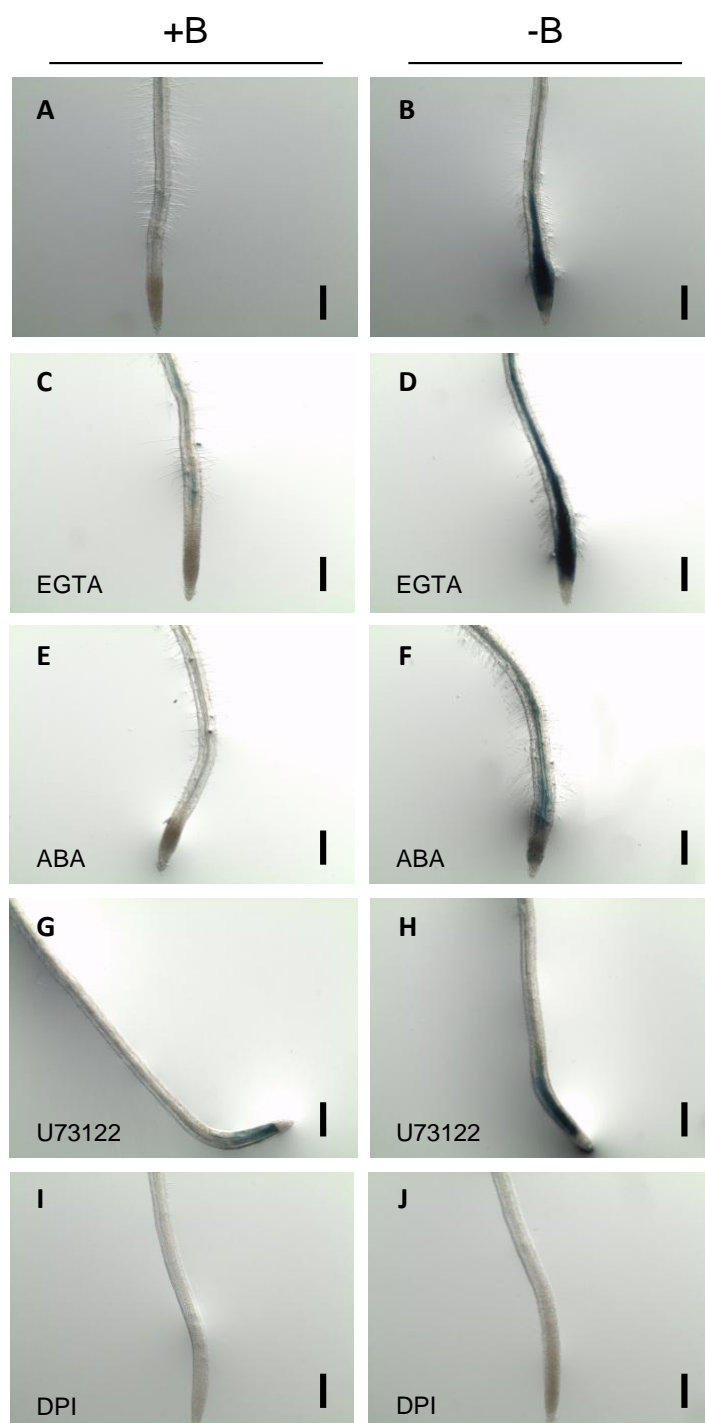


Figura 38. Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión GUS de la línea reportera pCML24::GUS en las raíces de arabidopsis. La actividad del promotor del gen *CML24* fue analizada en plántulas tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G, I) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J) en presencia de EGTA 1 mM (C, D), ABA 5 μ M (E, F), U73122 5 μ M (G, H) o DPI 10 μ M (I, J). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes en los que se analizaron al menos 10 plántulas en cada uno. Escala: 200 μ m.

Línea pCPK28::GUS

La expresión GUS se detectó fundamentalmente en la zona de elongación en condiciones de suficiencia de B (**Figura 39A**). Tras 24 h en deficiencia de B la actividad de este promotor fue mayor en las zonas de elongación y maduración (cilindro central) (**Figura 39B**).

En las plantas cultivadas con B, la adición de EGTA, ABA, U73122 o DPI disminuyó la expresión GUS en la zona de elongación (**Figura 39A,C,E,G,I**).

En las plantas sometidas a deficiencia de B, la aplicación de ABA, U73122 y, sobre todo, DPI disminuyó la expresión GUS en las zonas de elongación y maduración (cilindro central) (**Figura 39B,F,H,J**). La adición de EGTA apenas alteró la actividad del promotor del gen *CPK28* (**Figura 39B,D**).

Si se comparan los dos tratamientos de B, en las plantas tratadas con EGTA o ABA la deficiencia de B incrementó la expresión GUS en la zona de elongación y, además, en el caso del EGTA también en el cilindro central de la zona de maduración (**Figura 39C-F**). Sin embargo, en las plantas tratadas con U73122 o DPI la disponibilidad de B no modificó su expresión (**Figura 39G-J**).

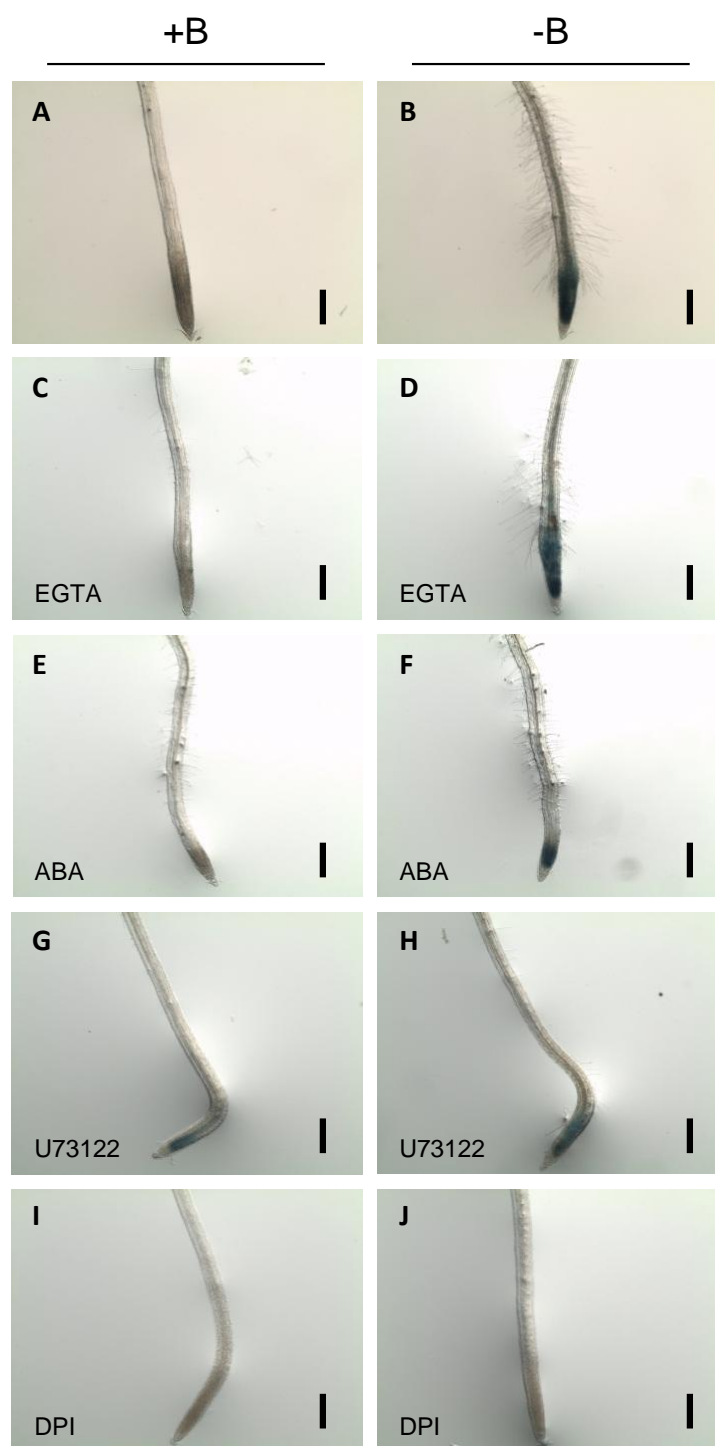


Figura 39. Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión GUS de la línea reportera pCPK28::GUS en las raíces de arabidopsis. La actividad del promotor del gen *CPK28* fue analizada en plántulas tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G, I) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J) en presencia de EGTA 1 mM (C, D), ABA 5 μ M (E, F), U73122 5 μ M (G, H) o DPI 10 μ M (I, J). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes en los que se analizaron al menos 10 plántulas en cada uno. Escala: 200 μ m.

Línea pMYB15::GUS

La actividad del promotor del gen *MYB15* se localizó en el cilindro central de las plantas tratadas con B, y fue considerablemente mayor tras 24 h de deficiencia en B (**Figura 40A,B**).

En las plantas con B, la adición de EGTA, ABA, U73122 o DPI prácticamente no modificó la expresión GUS (**Figura 40A,C,E,G,I**).

En las plantas con limitación de B, la aplicación de EGTA no alteró la actividad de este promotor (**Figura 40B,D**). Sin embargo, en presencia de los otros compuestos la actividad en el cilindro central fue menor, especialmente en presencia de DPI (**Figura 40B,F,H,J**).

Cuando se comparan ambos tratamientos de B, en las plantas con EGTA se observó una expresión similar a la de sus respectivos controles (**Figura 40A-D**). La adición de ABA aumentó la expresión en la zona meristemática-elongación (**Figura 40E,F**). Mientras que U73122 apenas modificó la expresión GUS, la aplicación de DPI disminuyó notablemente la actividad de este promotor (**Figura 40I,J**).

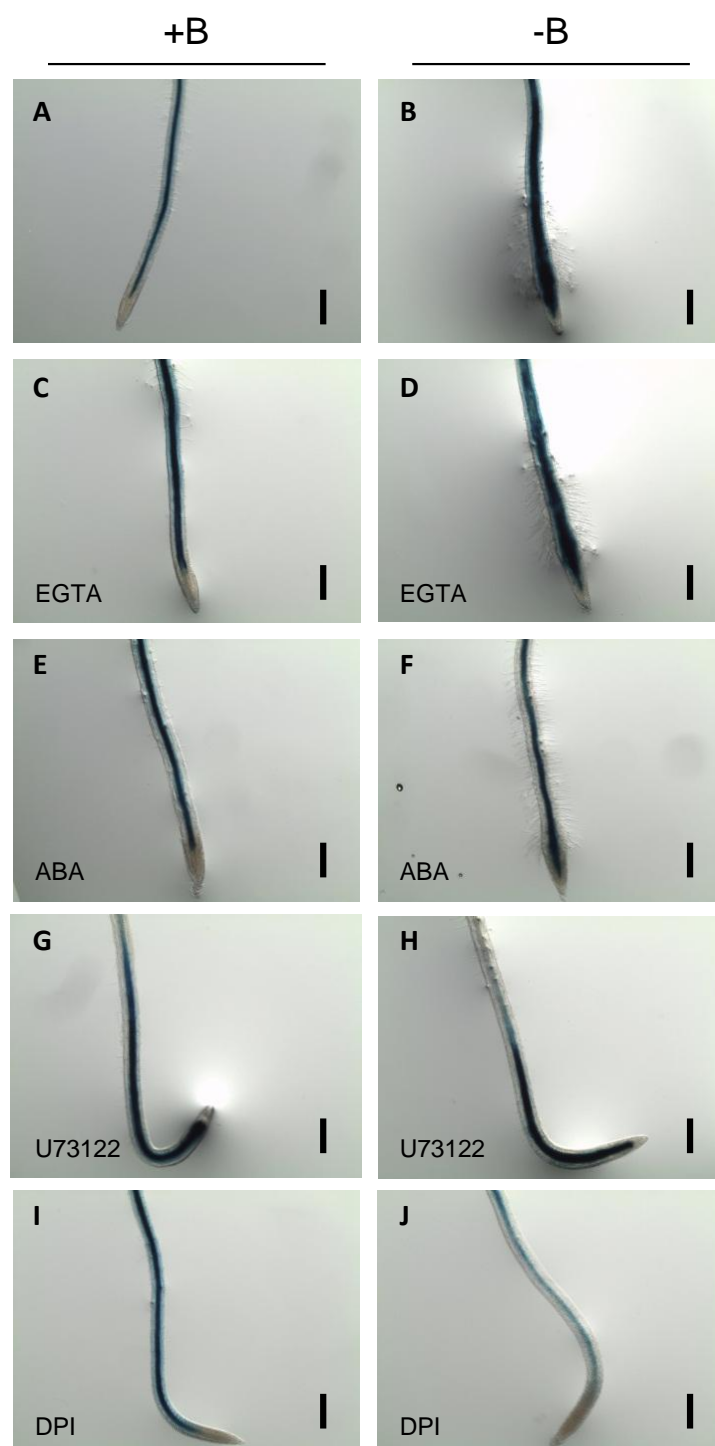


Figura 40. Efecto de la deficiencia de B sobre la expresión GUS de la línea reportera pMYB15::GUS en las raíces de arabidopsis. La actividad del promotor del gen *MYB15* fue analizada en plántulas tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G, I) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J) en presencia de EGTA 1 mM (C, D), ABA 5 μ M (E, F), U73122 5 μ M (G, H) o DPI 10 μ M (I, J). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes en los que se analizaron al menos 10 plántulas en cada uno. Escala: 200 μ m.

III.2. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE DIVERSOS NUTRIENTES

III.2.1. Contenidos de boro soluble, insoluble y total

Se estudió el efecto de la deficiencia de B durante 24 h sobre los niveles de B soluble, insoluble y total tanto en el genotipo silvestre Col-0 como en la línea reportera Col0::YC3.6, que se empleó para visualizar los cambios en el contenido de Ca^{2+} citosólico mediante microscopía confocal (**apartado III.5**).

En la **Figura 41A** se muestra el efecto que tuvo la deficiencia en B durante 24 h sobre los niveles de B soluble. Se observó que esta deficiencia causó en los dos genotipos una reducción significativa de la concentración de B soluble y que, además, tuvieron una concentración similar en ambos tratamientos de B.

El análisis del efecto de la deficiencia en B sobre los niveles de B insoluble se recoge en la **Figura 41B**. Esta deficiencia causó una reducción significativa en la concentración de B insoluble en los genotipos Col-0 y Col0::YC3.6. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido de B insoluble entre ambas líneas.

Finalmente, se investigó el efecto de la deficiencia en B sobre los niveles de B total (**Figura 41C**). Como consecuencia de los anteriores análisis, el déficit de B causó en los dos genotipos una reducción significativa en la concentración total de B y, además, ambas líneas tuvieron valores similares de B total en los dos tratamientos.

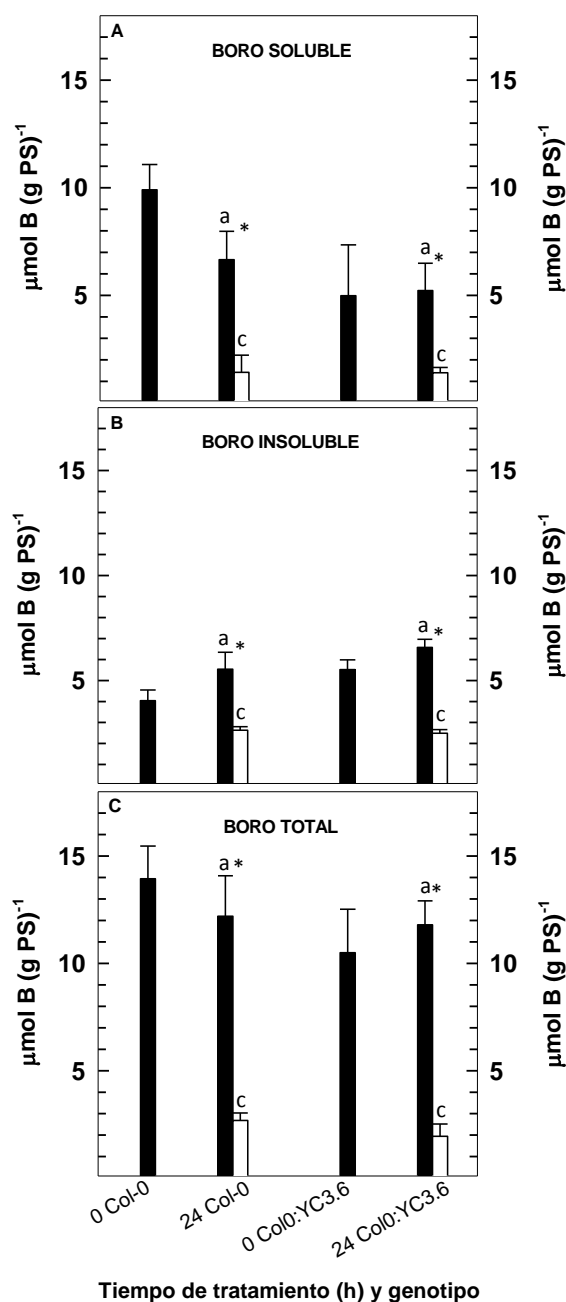


Figura 41. Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de B soluble (A), insoluble (B) y total (C) en las raíces de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre y Col0::YC3.6 sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h. La extracción de B y su determinación se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cuatro grupos de 20 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). Se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre los dos genotipos a las 24 h (letras: **a** y **b** para el tratamiento de suficiencia de B; **c** y **d** para el de deficiencia).

III.2.2. Contenidos de cationes: Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ y Na^+

Se estudió también el efecto de la deficiencia en B sobre la concentración de los cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ y Na^+ en las raíces de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, *cb1/4/5/9*, *aca10*, *cax3* y *cngc19* sometidos a deficiencia en B durante 24 h. Además, en el genotipo silvestre se analizó el efecto del tratamiento con EGTA 1 mM.

El análisis de los niveles de Ca^{2+} mostró que el tratamiento de deficiencia en B causó un aumento en la concentración de este catión en el mutante *aca10*, en comparación con el de suficiencia de B, aumento que fue significativamente mayor que en Col-0 (**Figura 42**). Por otra parte, en el genotipo *cax3* se observó el efecto opuesto, ya que el déficit de B provocó una reducción en los niveles de Ca^{2+} en relación con el tratamiento de suficiencia de B. En el resto de los genotipos estudiados no se apreciaron diferencias significativas asociadas a la deficiencia de B (**Figura 42**).

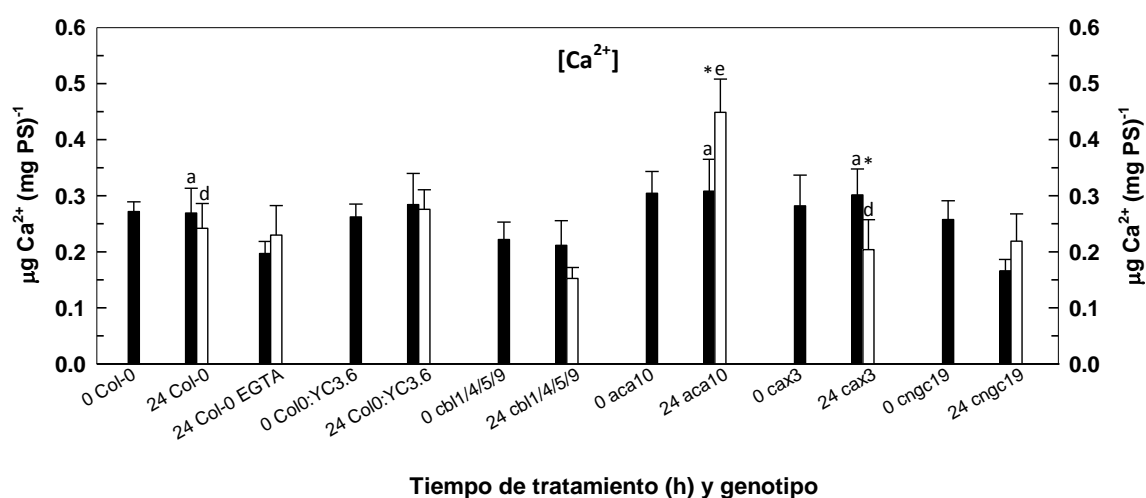


Figura 42. Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de calcio en las raíces de arábidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, *cb1/4/5/9*, *aca10*, *cax3* y *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h. La concentración se determinó como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de EGTA utilizada en Col-0 fue de 1 mM. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cinco grupos de 20 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). Se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre esos genotipos y Col-0 (letras: **a**, **b** y **c** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **d**, **e** y **f** para el de 24 h en deficiencia).

El estudio de la concentración de Mg^{2+} mostró que en los mutantes *cbi1/4/5/9* y *cax3* el tratamiento con déficit de B provocó una reducción en los niveles de Mg^{2+} , que fue significativamente menor que en Col-0 (**Figura 43**). En el resto de las líneas estudiadas no se apreció ningún efecto significativo asociado a la deficiencia de B.

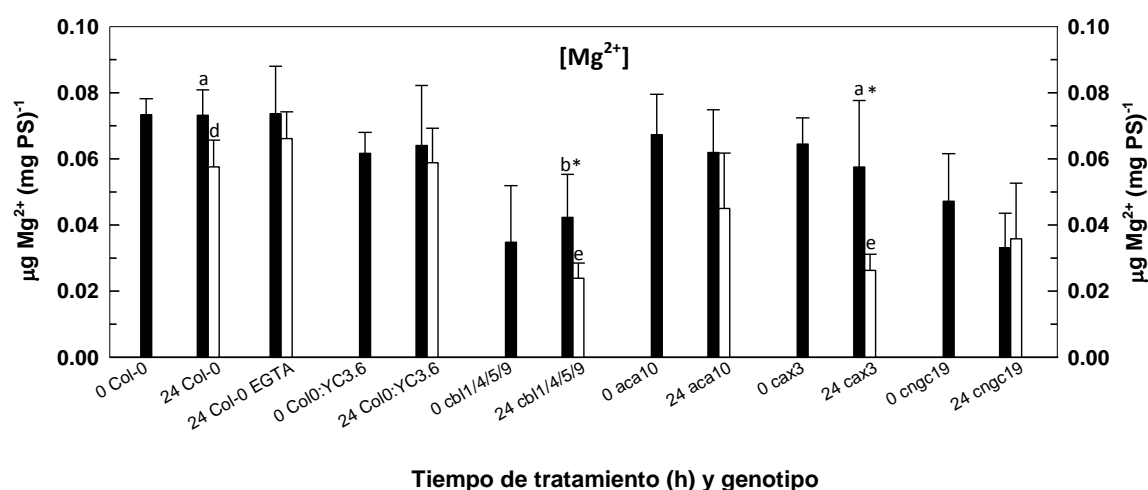


Figura 43. Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de magnesio en las raíces de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, *cbi1/4/5/9*, *aca10*, *cax3* y *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h. La concentración se determinó como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de EGTA utilizada en Col-0 fue de 1 mM. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cinco grupos de 20 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (*p*-valor < 0,05). Se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (*p*-valor < 0,05) entre esos genotipos y Col-0 (letras: **a**, **b** y **c** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **d**, **e** y **f** para el de 24 h en deficiencia).

En la **Figura 44** se muestran los resultados obtenidos para el análisis del efecto de la deficiencia en B sobre la concentración del catión NH_4^+ . No se observaron diferencias significativas como consecuencia de este tratamiento en ninguno de los genotipos.

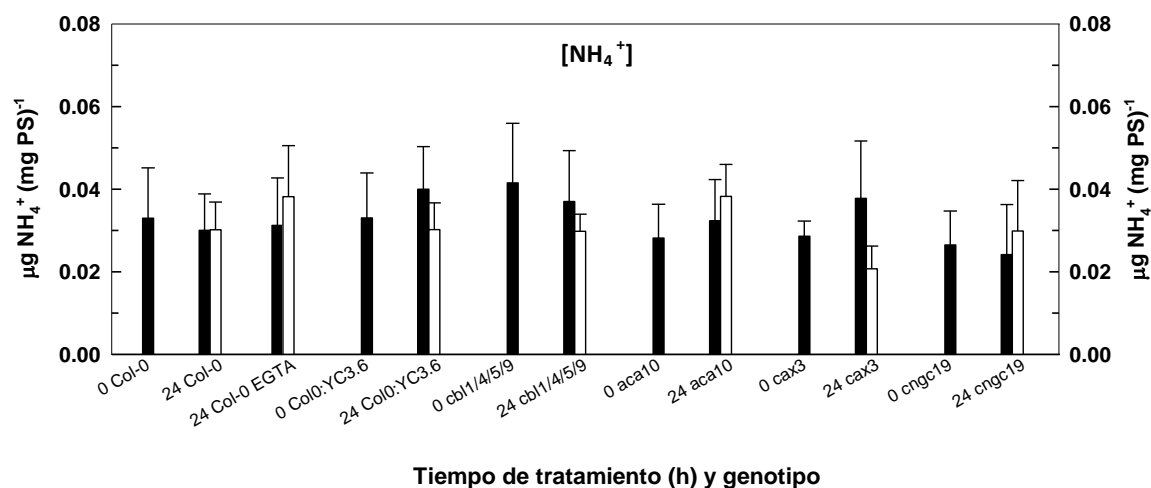


Figura 44. Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de amonio en las raíces de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, *cbl1/4/5/9*, *aca10*, *cax3* y *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h. La concentración se determinó como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de EGTA utilizada en Col-0 fue de 1 mM. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cinco grupos de 20 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05).

El efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de K^+ se muestra en la **Figura 45**. Tan solo en los mutantes *cbi1/4/5/9* y *cax3* se observaron diferencias significativas como consecuencia del tratamiento con deficiencia en B durante 24 h. En ambos casos se dio una reducción de la concentración de K^+ en comparación con el tratamiento de suficiencia. Es de destacar que *cbi1/4/5/9* tuvo una concentración de este catión sensiblemente menor que la de Col-0.

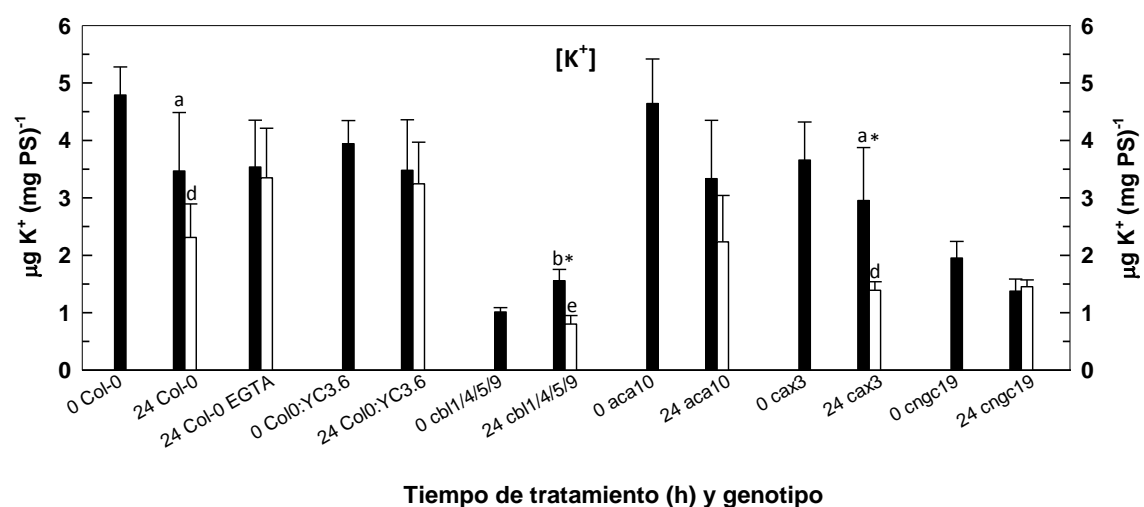


Figura 45. Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de potasio en las raíces de arabidopsis de los genotipos Col-0, Col-0::YC3.6, *cbi1/4/5/9*, *aca10*, *cax3* y *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h. La concentración se determinó como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de EGTA utilizada en Col-0 fue de 1 mM. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cinco grupos de 20 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor $< 0,05$). Se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) entre esos genotipos y Col-0 (letras: **a**, **b** y **c** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **d**, **e** y **f** para el de 24 h en deficiencia).

Por último, el efecto de la deficiencia en B sobre la concentración de Na^+ se representa en la **Figura 46**. En ninguno de los genotipos hubo diferencias significativas como consecuencia de este tratamiento. Sin embargo, el mutante *cbi1/4/5/9* presentó unas concentraciones muy elevadas para este catión, de hasta seis veces superior a la obtenida en Col-0.

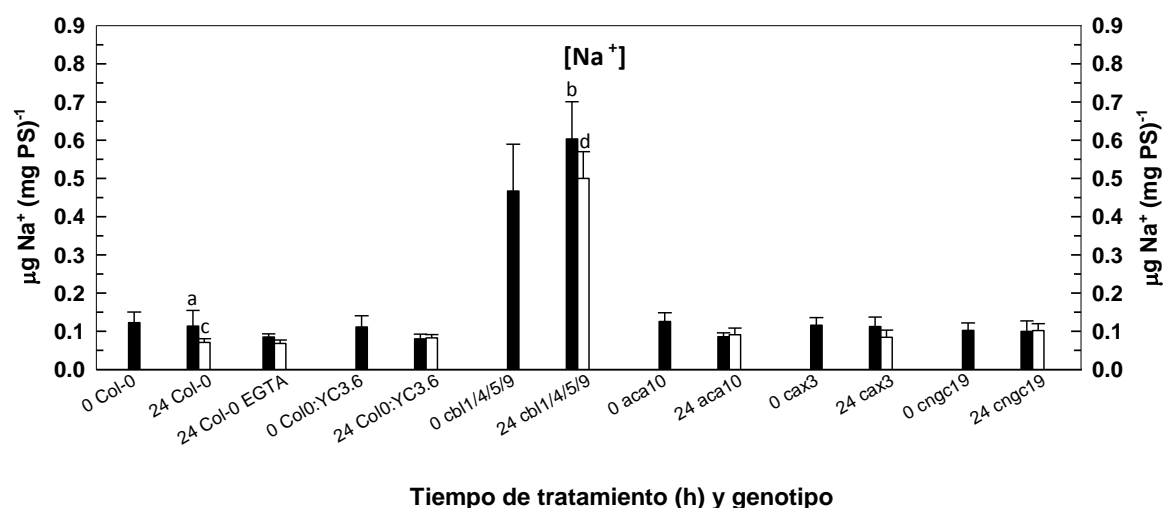


Figura 46. Efecto de la deficiencia de B sobre la concentración de sodio en las raíces de arábidopsis de los genotipos Col-0, Col0::YC3.6, *cbi1/4/5/9*, *aca10*, *cax3* y *cngc19* sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h. La concentración se determinó como se describe en Materiales y Métodos. La concentración de EGTA utilizada en Col-0 fue de 1 mM. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de cinco grupos de 20 plantas cada uno. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (*p*-valor < 0,05). Se han utilizado letras diferentes para indicar que las medias son estadísticamente significativas (*p*-valor < 0,05) entre esos genotipos y Col-0 (letras: **a** y **b** para el tratamiento de 24 h en suficiencia de B; **c** y **d** para el de 24 h en deficiencia).

III.3. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA MORFOLOGÍA DE LA RAÍZ PRINCIPAL

III.3.1. Crecimiento longitudinal de la raíz principal

Se estudió cómo la deficiencia en B afecta al crecimiento de la raíz principal de plántulas de los genotipos Col-0, *aca10*, *cax3*, *cbl1/4/5/9*, *cml24*, *cngc19*, *gata4*, *myb15* y *wrky46*. Para ello se llevó a cabo un análisis del crecimiento de la raíz principal de las plántulas tras 24, 48, 72 y 96 h con suficiencia y deficiencia de B. Los resultados obtenidos se recogen en la **Figura 47**. En todos los genotipos estudiados, la deficiencia de B provocó una reducción significativa de la longitud de la raíz principal desde las 24 hasta las 96 h de tratamiento.

A partir de los datos de la **Figura 47** se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento de la raíz principal en cada genotipo tras 96 h de deficiencia de B, los cuales se resumen en el siguiente cuadro:

Col-0	<i>aca10</i>	<i>cax3</i>	<i>cbl1/4/5/9</i>	<i>cml24</i>	<i>cngc19</i>	<i>gata4</i>	<i>myb15</i>	<i>wrky46</i>
96,0	95,5	94,2	95,3	85,8	79,3	88,9	93,2	95,0

Los resultados indicaron que en los genotipos Col-0, *aca10*, *cax3*, *cbl1/4/5/9*, *myb15* y *wrky46* la deficiencia en B causó una inhibición del crecimiento de la raíz principal alrededor del 95 % tras 96 h de tratamiento. Sin embargo, en los genotipos *cml24*, *cngc19* y *gata4* fue menor (85,8, 79,3 y 88,9 %, respectivamente). Es de destacar que *cngc19* fue el que tuvo una menor inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal como consecuencia del tratamiento con deficiencia de B.

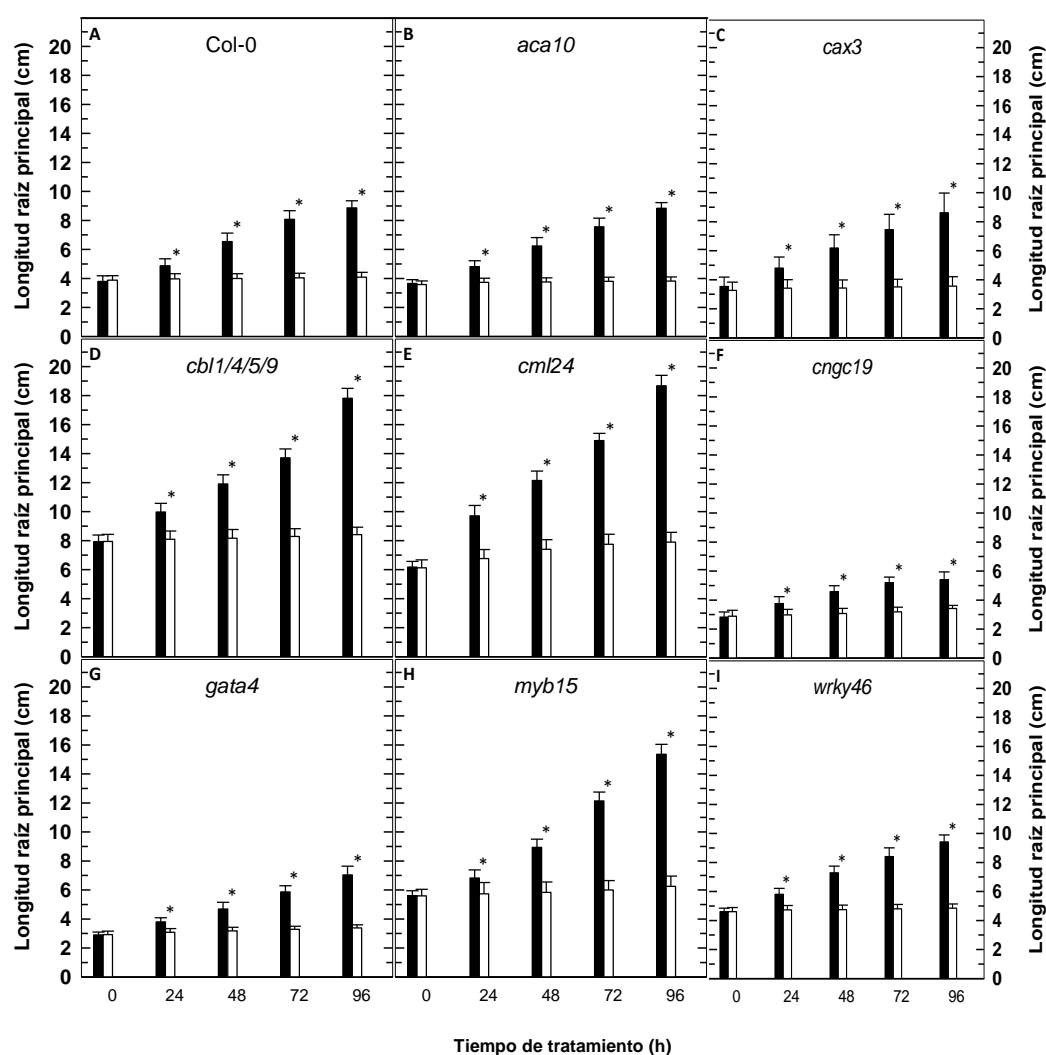


Figura 47. Efecto de la deficiencia de B sobre la longitud de la raíz principal de *Arabidopsis* de los genotipos Col-0 (A), *aca10* (B), *cax3* (C), *cbl1/4/5/9* (D), *cml24* (E), *cngc19* (F), *gata4* (G), *myb15* (H) y *wrky46* (I) sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24, 48, 72 y 96 h. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de al menos 25 plantas diferentes. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (p -valor < 0,05).

III.3.2. Grosor del ápice de la raíz principal

El análisis del efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal se continuó con el estudio del grosor apical. Para ello, las plántulas de los genotipos Col-0, *bzip34*, *cbl1/4/5/9*, *gata4*, *myb15* y *wrky46* se sometieron a un tratamiento de 24 h de deficiencia en B, tras el cual se midió el diámetro del ápice de la raíz principal.

Los resultados mostraron que en todos los genotipos estudiados la deficiencia en B provocó un aumento significativo del diámetro apical de la raíz principal. No se observaron diferencias entre los valores obtenidos en los genotipos mutantes en comparación con los del silvestre (**Figura 48**).

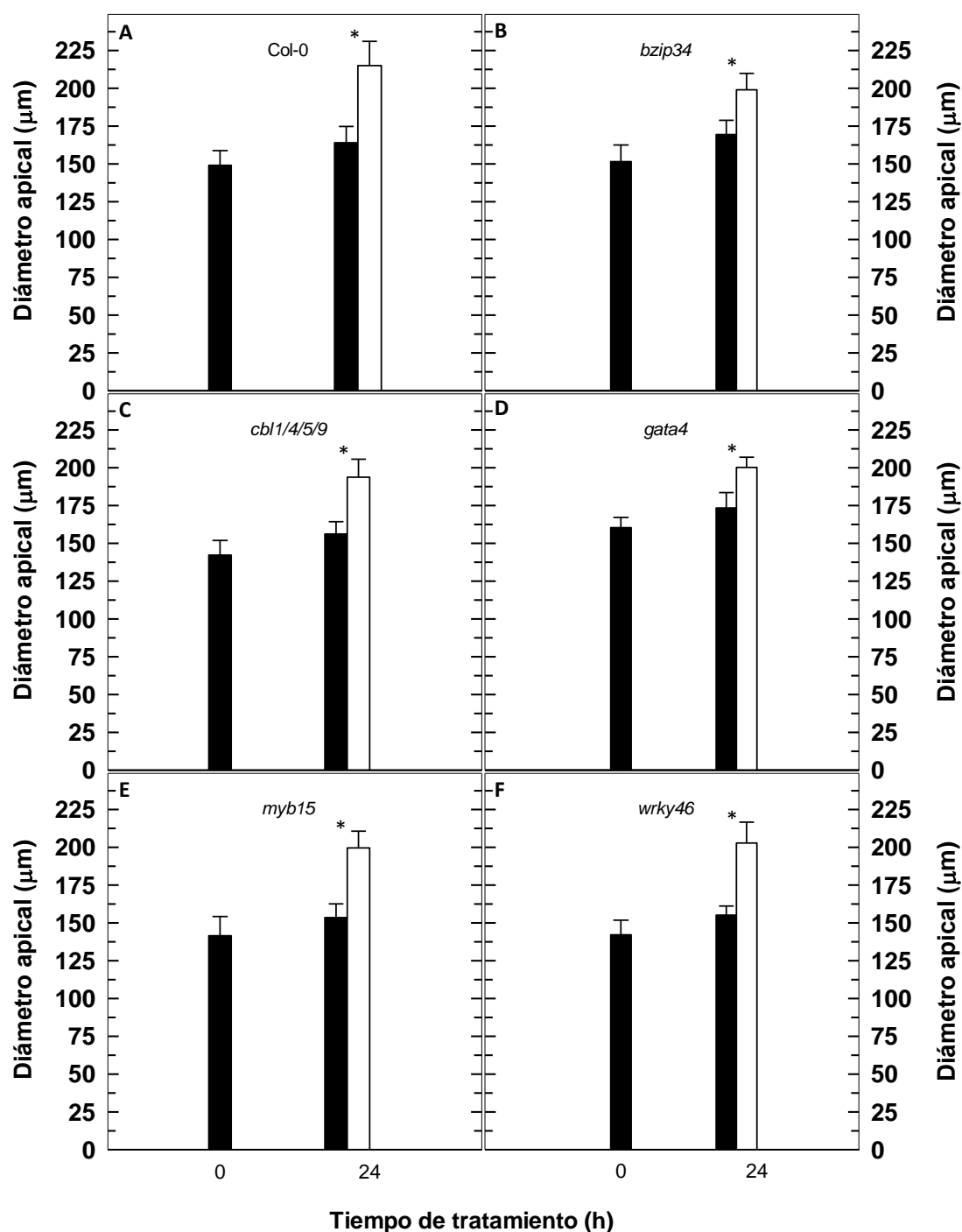


Figura 48. Efecto de la deficiencia de B sobre el diámetro del ápice de la raíz principal de arabisopsis de los genotipos Col-0 (A), *bzip34* (B), *cbl1/4/5/9* (C), *gata4* (D), *myb15* (E) y *wrky46* (F) sometidos (barra blanca) o no (barra negra) a deficiencia en B durante 24 h. Los resultados son la media \pm desviación estándar del análisis de al menos 55 plantas diferentes. Con asterisco (*) se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de B según el test *t*-Student (*p*-valor < 0,05).

III.3.3. Morfología del ápice de la raíz principal

Finalmente, se estudió cómo afectó la deficiencia de B a la morfología del ápice de la raíz principal en plántulas de los genotipos Col-0, *bzip34*, *cbl1/4/5/9*, *gata4*, *myb15* y *wrky46* sometidos a 24 h de deficiencia en B.

Los resultados mostraron que en todos los genotipos se desarrolló la formación de pelos radicales, así como el engrosamiento apical descrito anteriormente (**Figura 49**). No se observaron diferencias apreciables entre el fenotipo de las distintas estirpes estudiadas, ni en suficiencia ni en deficiencia de B.

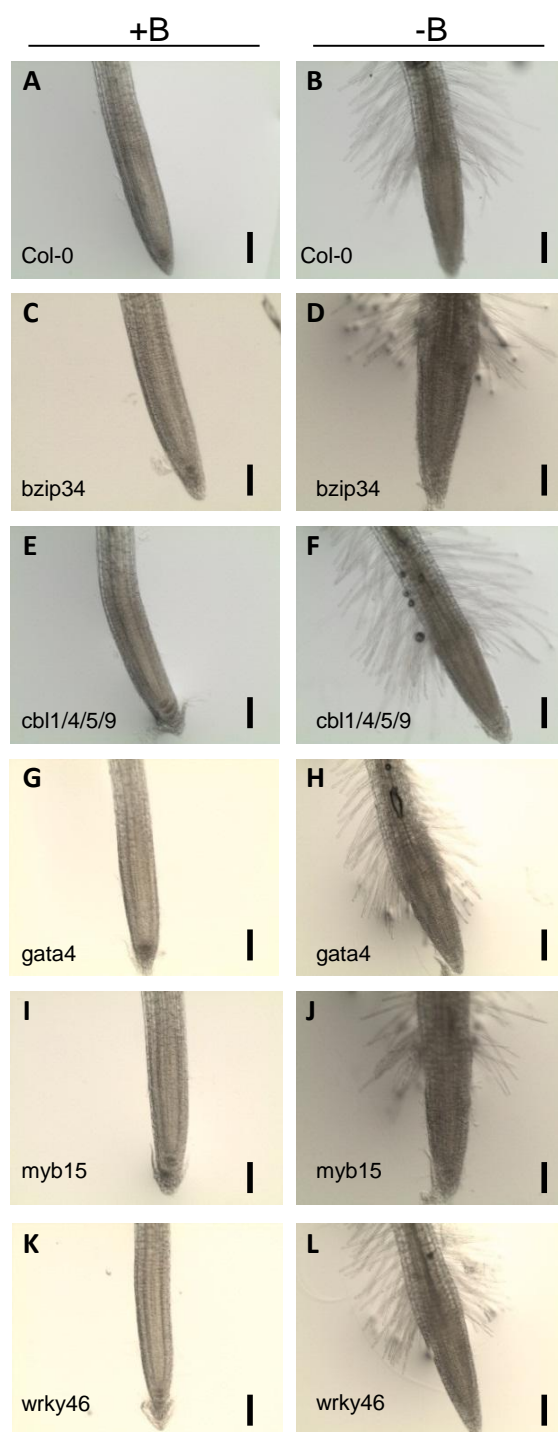


Figura 49. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología del ápice de la raíz principal de *arabidopsis* de los genotipos Col-0 (A, B), *bzip34* (C, D), *cbl1/4/5/9* (E, F), *gata4* (G, H), *myb15* (I, J) y *wrky46* (K, L) tratados con B 2 μ M (A, C, E, G, I, K) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J, L). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes en los que se analizaron al menos 10 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

III.4. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BORO SOBRE LOS NIVELES DE CALCIO CITOSÓLICO EN LA RAÍZ PRINCIPAL

Con el fin de determinar el efecto de la deficiencia de B a corto plazo (6 y 24 h) sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico en la raíz principal de plántulas de *Arabidopsis*, se emplearon líneas transgénicas que expresan de forma estable la construcción Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6). Estas líneas reporteras permitieron hacer un seguimiento de las variaciones en los niveles de Ca^{2+} citosólico empleando técnicas de microscopía de fluorescencia.

III.4.1. Análisis de los niveles de calcio citosólico mediante microscopía confocal

En este apartado se visualizaron los cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico en los genotipos Col0::YC3.6, *aca10*::YC3.6, *cax3*::YC3.6, *cbi1/4/5/9*::YC3.6, *cngc19*::YC3.6, *cml24*::YC3.6, *cpk28*::YC3.6, *cpk29*::YC3.6, *bzip34*::YC3.6, *gata4*::YC3.6, *myb15*::YC3.6 y *wrky46*::YC3.6. Además, en el caso de la línea reportera Col0::YC3.6 se estudió si se modifica el contenido de Ca^{2+} citosólico por la adición de diversos compuestos que pueden alterar la disponibilidad de Ca^{2+} .

III.4.1.1. Genotipo Col0::YC3.6

Las plántulas de este genotipo se sometieron a 6 y 24 h de deficiencia en B y se analizó su efecto sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico (**Figura 50**). La deficiencia en B produjo un aumento en los niveles de Ca^{2+} en la raíz principal a las 6 h y, especialmente, a las 24 h. Los mayores niveles de Ca^{2+} citosólico se detectaron en la zona meristemática, epidermis de la zona de elongación y endodermis/periciclo de la zona de maduración (**Figura 50B,D**).

También se tomaron imágenes de las plántulas en campo claro con el fin de estudiar los efectos de estos tratamientos sobre la morfología de la raíz principal (**Figura 51**); se observó que tras 6 h de déficit de B comenzaron a desarrollarse los pelos radicales en la zona de maduración (**Figura 51B**). Además, tras 24 h de ausencia

de B, la raíz principal experimentó un engrosamiento del ápice, acortamiento de la zona de elongación y la proliferación de pelos radicales (**Figura 51D**).

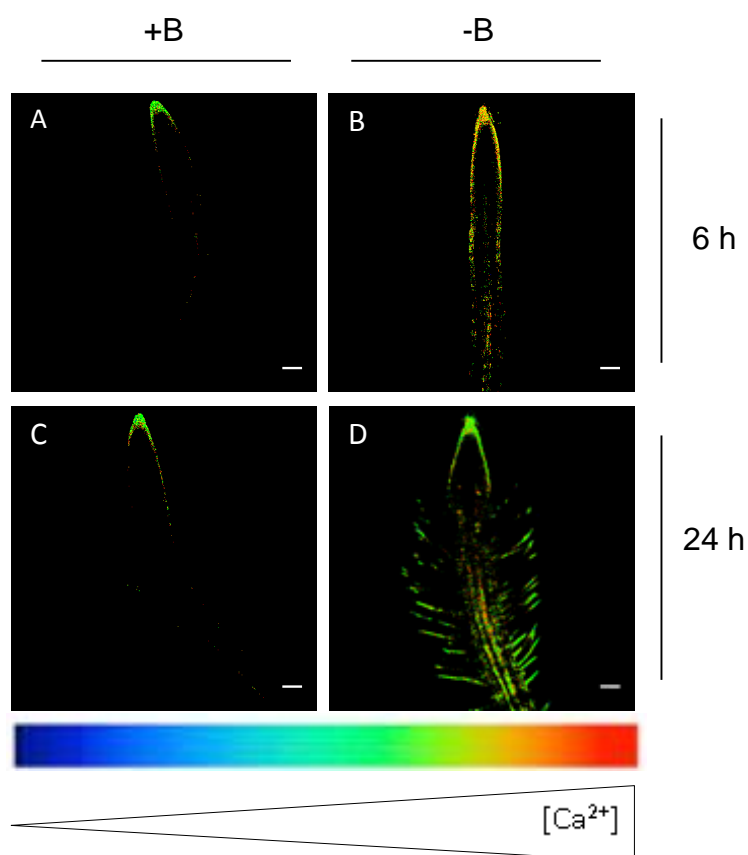


Figura 50. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal de plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C) o en deficiencia de B (B, D) durante 6 (A, B) o 24 h (C, D). Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

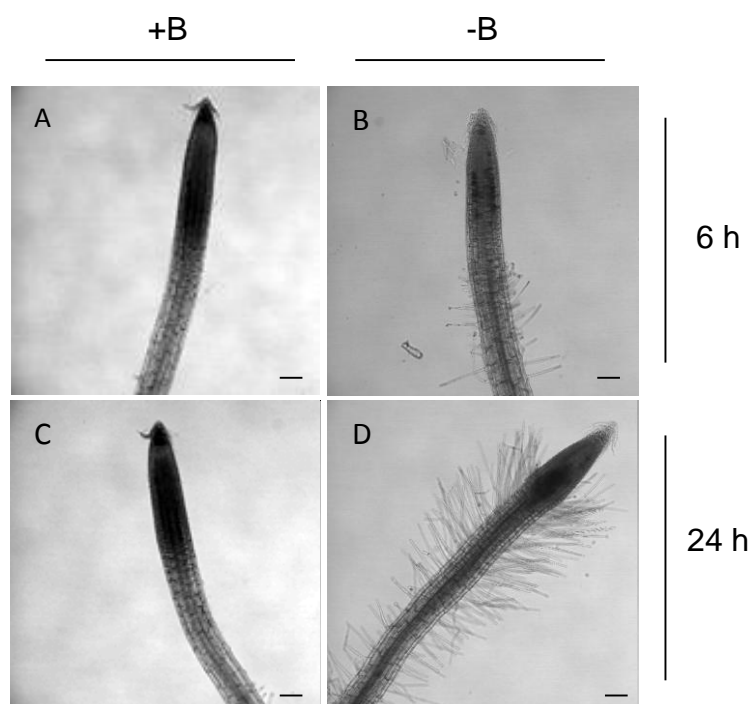


Figura 51. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal de plántulas de *arabidopsis* tratadas con B 2 μ M (A, C) o en deficiencia de B (B, D) durante 6 (A, B) o 24 h (C, D). Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

Con el fin de restaurar los niveles basales de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal de plántulas que habían sido sometidas a un tratamiento con déficit de B durante 24 h, plántulas de la línea Col0::YC3.6 se trataron con suficiencia de B durante 1, 3, 6 o 24 h. A los tiempos indicados se tomaron imágenes mediante microscopía confocal para visualizar los cambios en el contenido de Ca^{2+} citosólico (**Figura 52**).

Como control, aquellas plántulas que habían sido sometidas a 24 h de suficiencia de B no mostraron variaciones en los niveles de Ca^{2+} citosólico tras 1, 3, 6 o 24 h de tratamiento con B (**Figura 52A-D**). Sin embargo, las que procedían de un tratamiento de 24 h de déficit de B tuvieron los mayores niveles de Ca^{2+} citosólico tras 1 h con B (**Figura 52E**) y, progresivamente, fueron disminuyendo hasta alcanzar niveles similares a los de las plántulas control (**Figura 52F-H,A-D**).

Como era de esperar, el análisis morfológico de la raíz principal de las plántulas control mostró que no hubo diferencias entre las plántulas procedentes del tratamiento con 24 h de suficiencia de B (**Figura 53A-D**). Las plántulas con déficit de B y sometidas posteriormente a 1, 3 y 6 h de tratamiento con B todavía mostraron el engrosamiento del ápice, el acortamiento de la zona de elongación y la proliferación de pelos radicales característicos de la deficiencia de B (**Figura 53E-G**). Sin embargo, aquellas plántulas que habían estado durante 24 h en suficiencia de B experimentaron una recuperación parcial de la morfología de la raíz principal al ir desapareciendo el engrosamiento del ápice y al expandirse la zona de elongación (**Figura 53H**).

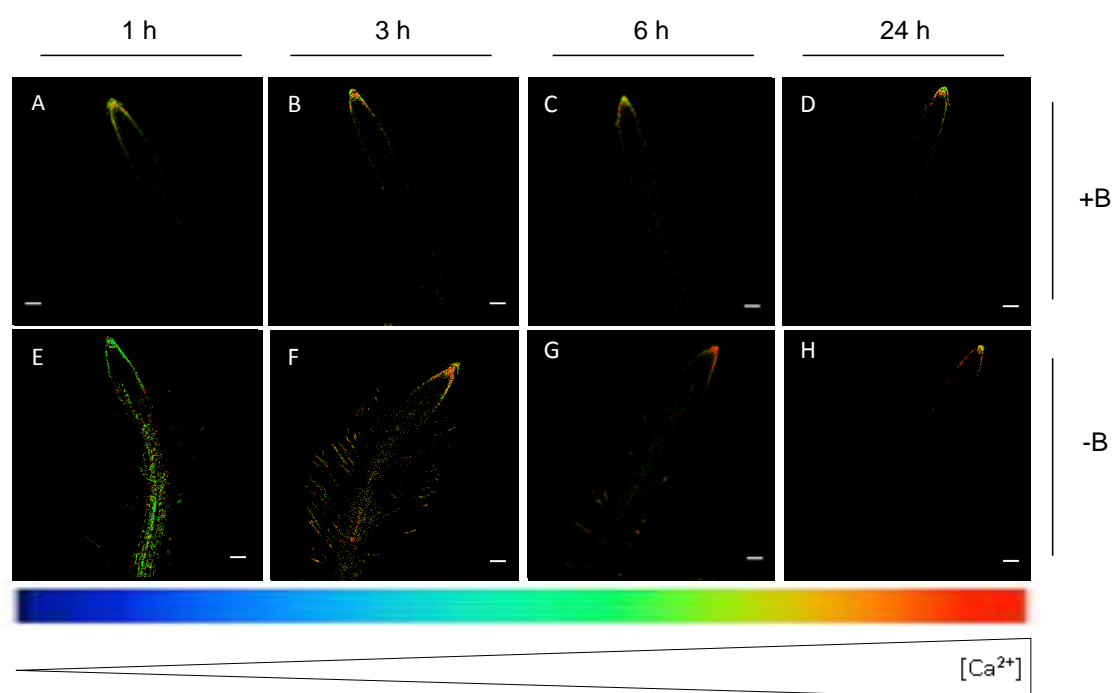


Figura 52. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de *arabidopsis* tratadas con B 2 μM (A, B, C, D) o en deficiencia de B (E, F, G, H) durante 24 h y, posteriormente, tratadas con B 2 μM durante 1 (A, E), 3 (B, F), 6 (C, G) o 24 h (D, H). Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μm .

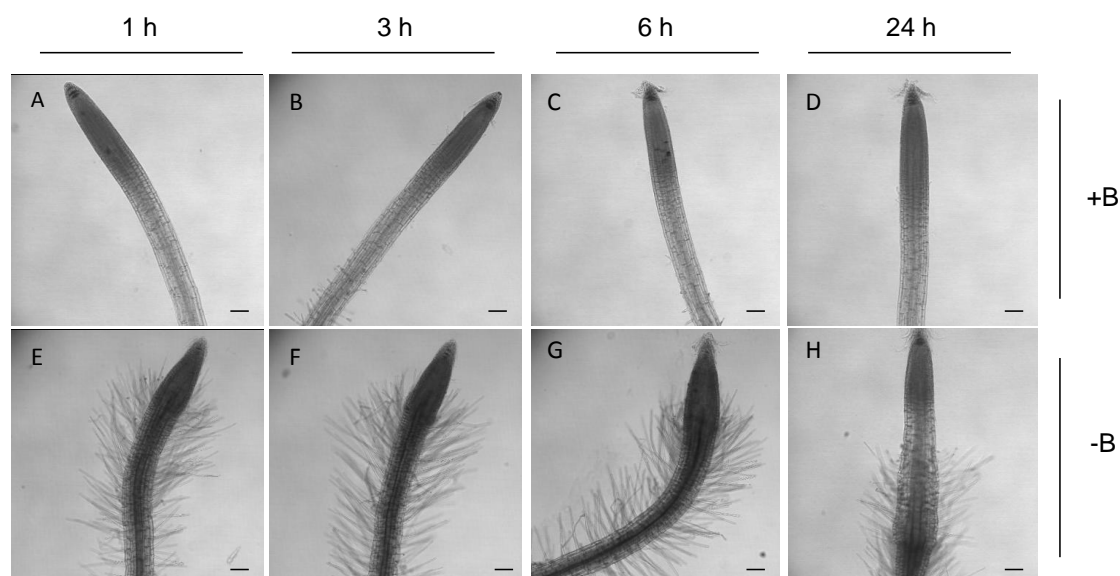


Figura 53. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de *arabidopsis* tratadas con B 2 μ M (A, B, C, D) o en deficiencia de B (E, F, G, H) durante 24 h y, posteriormente, tratadas con B 2 μ M durante 1 (A, E), 3 (B, F), 6 (C, G) o 24 h (D, H). Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

III.4.1.2. Genotipos mutantes

Las plántulas de los genotipos Col0::YC3.6, *aca10*::YC3.6, *cax3*::YC3.6, *cbl1/4/5/9*::YC3.6, *cngc19*::YC3.6, *cml24*::YC3.6, *cpk28*::YC3.6, *cpk29*::YC3.6, *bzip34*::YC3.6, *gata4*::YC3.6, *myb15*::YC3.6 y *wrky46*::YC3.6 se sometieron a 24 h de deficiencia en B y se analizó el efecto de este tratamiento sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal (**Figura 54**).

Se observó que las líneas *cax3*::YC3.6, *cngc19*::YC3.6, *cpk28*::YC3.6, *cpk29*::YC3.6, *bzip34*::YC3.6, *gata4*::YC3.6 y *myb15*::YC3.6 tuvieron los mismos niveles de Ca^{2+} citosólico en ambos tratamientos de B (**Figura 54**), y que fueron similares a los de la línea control Col0::YC3.6 en suficiencia en B (**Figura 54A**), si bien fueron menores que los que tuvo este genotipo en deficiencia de B (**Figura 54B**).

En los genotipos *aca10*::YC3.6 y *wrky46*::YC3.6 no se detectó ninguna señal de fluorescencia ni en deficiencia de B (**Figura 54D,W**) ni en suficiencia (**Figura 54C,V**).

Las plántulas del genotipo *cbl1/4/5/9::YC3.6* sometidas a 24 h de deficiencia en B no mostraron ninguna señal de fluorescencia (**Figura 54H**), pero sí en las sometidas a suficiencia (**Figura 54G**), las cuales tuvieron niveles similares a los de la línea Col0::YC3.6 en suficiencia de B (**Figura 54A**).

Finalmente, la línea *cm124::YC3.6* fue la única que tuvo unos niveles de fluorescencia en ambos tratamientos de B similares a los de la línea control Col0::YC3.6 (**Figura 54K,L,A,B**).

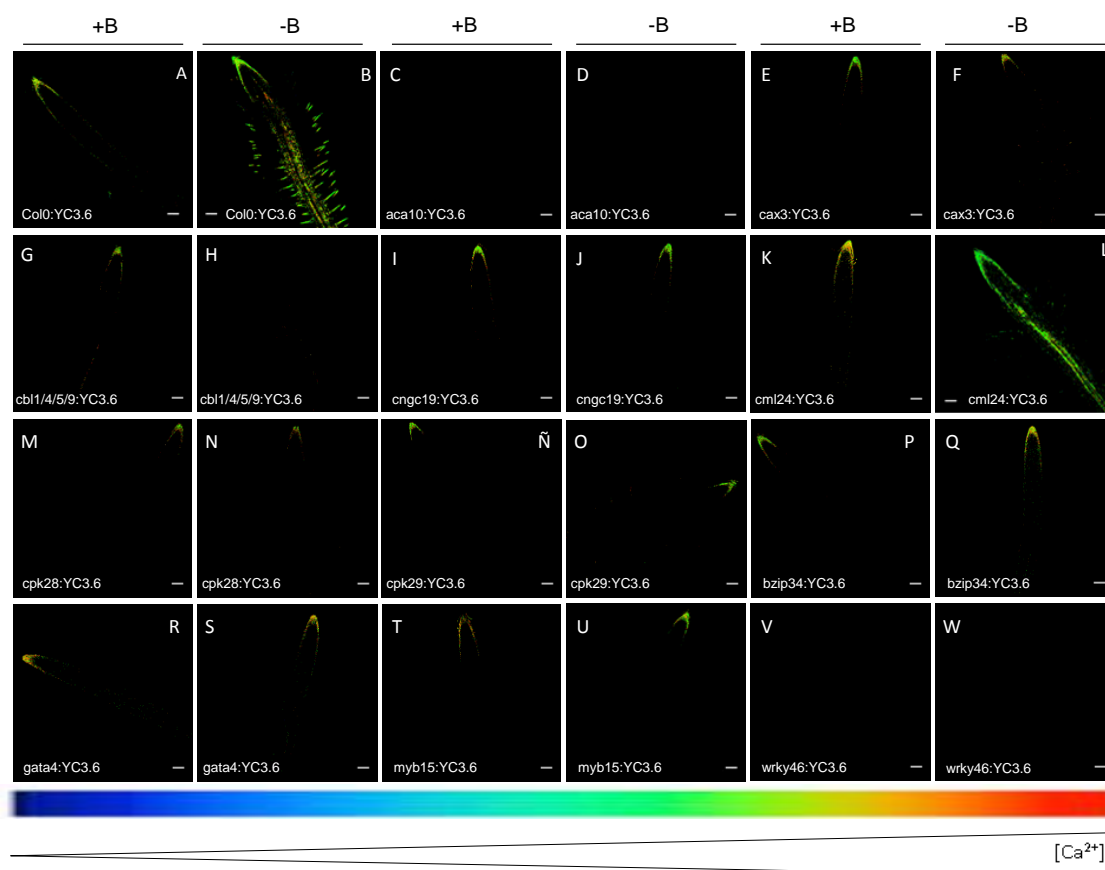


Figura 54. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal de *Arabidopsis* de los genotipos Col0::YC3.6 (A, B), *aca10::YC3.6* (C, D), *cax3::YC3.6* (E, F), *cbl1/4/5/9::YC3.6* (G, H), *cngc19::YC3.6* (I, J), *cm124::YC3.6* (K, L), *cpk28::YC3.6* (M, N), *cpk29::YC3.6* (Ñ, O), *bzip34::YC3.6* (P, Q), *gata4::YC3.6* (R, S), *myb15::YC3.6* (T, U) y *wrky46::YC3.6* (V, W) tratados con B 2 μM (A, C, E, G, I, K, M, Ñ, P, R, T, V) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J, L, N, O, Q, S, U, W) durante 24 h. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μm .

El análisis de la morfología de la raíz principal mostró que, independientemente del genotipo, la deficiencia en B provocó el engrosamiento del ápice, el acortamiento de la zona de elongación y la proliferación de los pelos radicales (**Figura 55**).

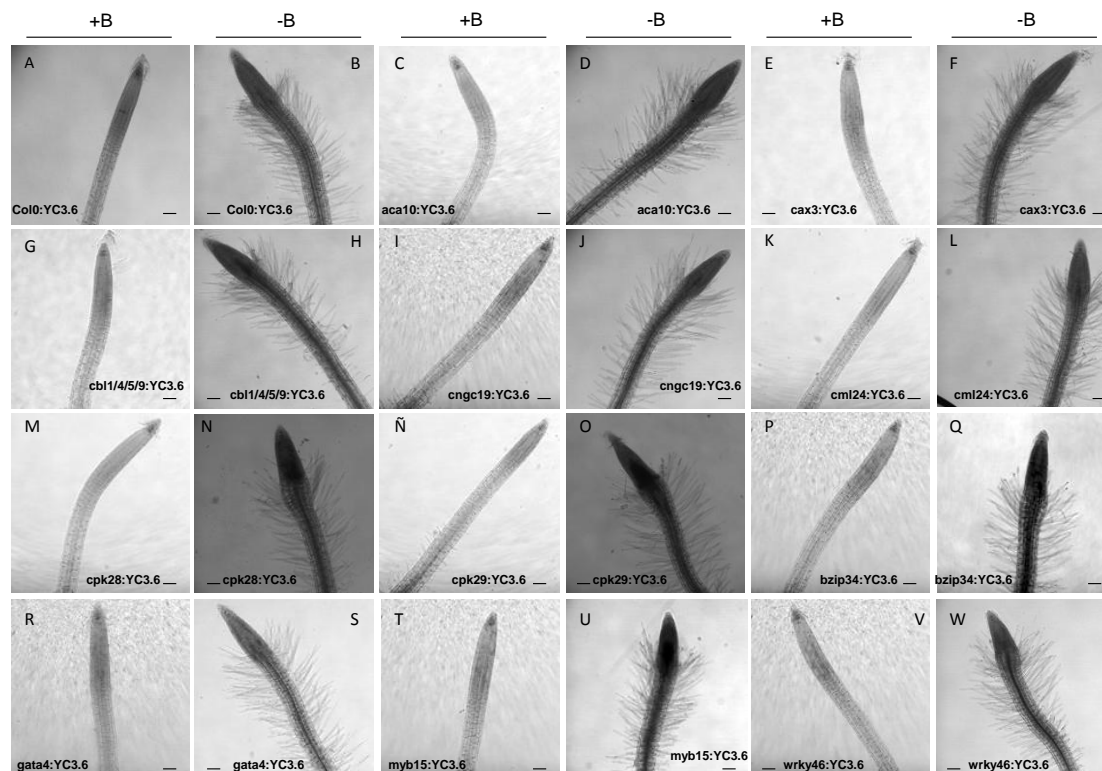


Figura 55. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de Arabidopsis de los genotipos Col0::YC3.6 (A, B), *aca10*::YC3.6 (C, D), *cax3*::YC3.6 (E, F), *cbl1/4/5/9*::YC3.6 (G, H), *cngc19*::YC3.6 (I, J), *cml24*::YC3.6 (K, L), *cpk28*::YC3.6 (M, N), *cpk29*::YC3.6 (Ñ, O), *bzip34*::YC3.6 (P, Q), *gata4*::YC3.6 (R, S), *myb15*::YC3.6 (T, U) y *wrky46*::YC3.6 (V, W) tratados con B 2 µM (A, C, E, G, I, K, M, Ñ, P, R, T, V) o en deficiencia de B (B, D, F, H, J, L, N, O, Q, S, U, W) durante 24 h. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 µm.

III.4.1.3. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de ABA

Se estudió el efecto del ABA 5 µM sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico en la raíz principal de plántulas de Col0::YC3.6 sometidas a deficiencia de B durante 6 y 24 h (**Figura 56**).

La adición de ABA aumentó los niveles de Ca^{2+} citosólico en ambos tratamientos de B (**Figura 56**), si bien fueron mayores en deficiencia de B y, especialmente, a las 24 h de tratamiento (**Figura 56H**).

Las imágenes de las plántulas en campo claro mostraron que los únicos cambios significativos en la morfología de la raíz principal se observaron en las plántulas con B y ABA, donde empezaron a desarrollarse los pelos radicales (**Figura 57C,G**), los cuales no aparecieron en ausencia de ABA (**Figura 57A,E**).

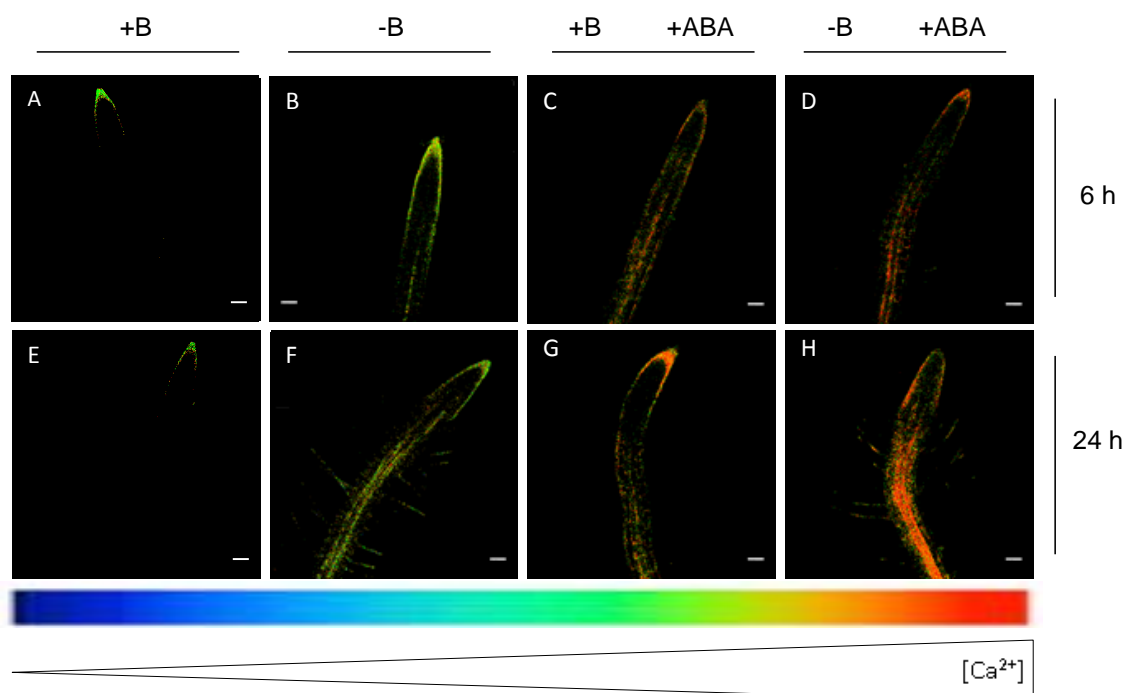


Figura 56. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μ M. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

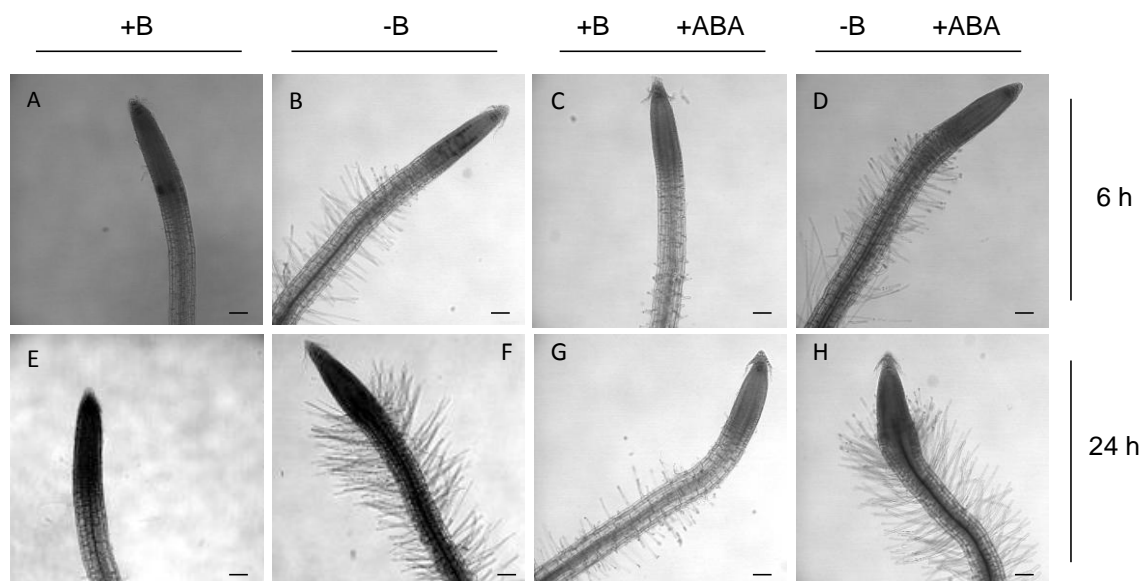


Figura 57. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de *arabidopsis* tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μ M. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

III.4.1.4. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de EGTA

Se estudió el efecto del EGTA 1 mM sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico en la raíz principal de plántulas de Col0::YC3.6 sometidas a deficiencia de B durante 6 y 24 h (**Figura 58**).

Las plántulas con déficit de B y en presencia de EGTA tuvieron unos niveles de Ca^{2+} citosólico inferiores a los observados en las plántulas sin EGTA tras 6 y 24 h de tratamiento (**Figura 58D,H,B,F**). Sin embargo, las plántulas con suficiencia de B no presentaron diferencias en los niveles de fluorescencia tras la adición de EGTA (**Figura 58C,G,A,E**).

Las imágenes de las plántulas en campo claro mostraron que el tratamiento con EGTA redujo la formación de pelos radicales y, aparentemente, el engrosamiento del ápice en las plántulas sometidas a deficiencia en B tanto a las 6 como a las 24 h (**Figura 59D,H,B,F**).

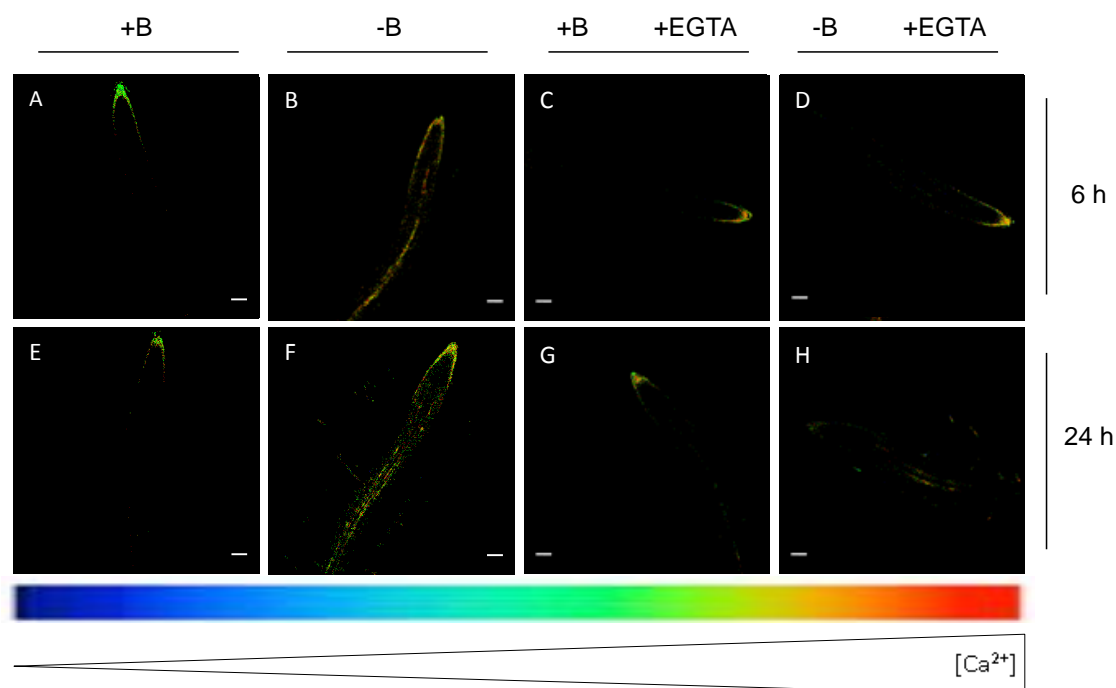


Figura 58. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de EGTA 1 mM. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

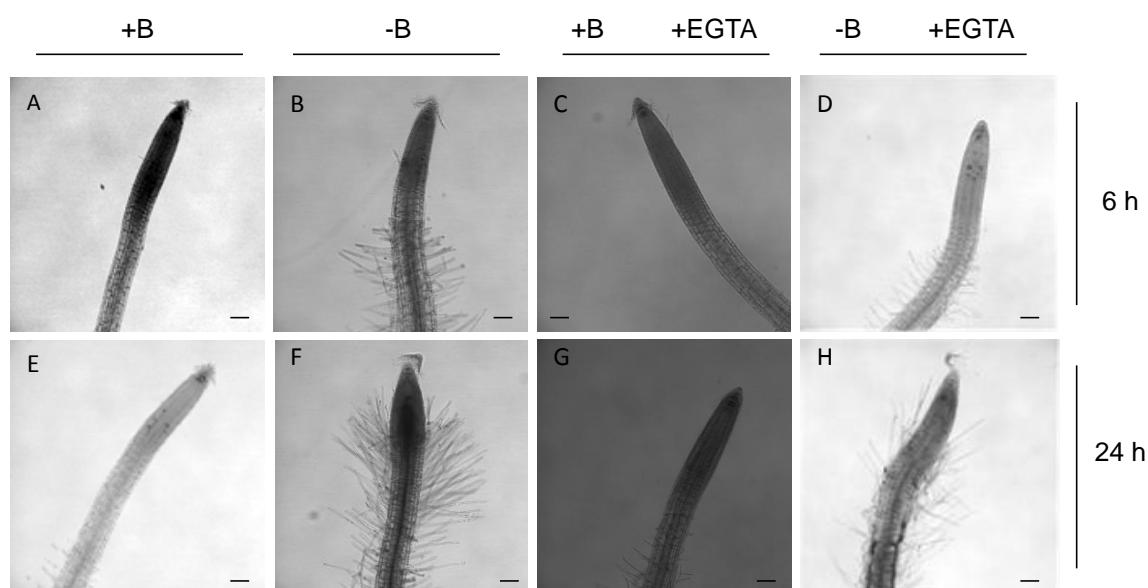


Figura 59. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de EGTA 1 mM. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

III.4.1.5. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de ABA y EGTA

Se estudió el efecto de la adición conjunta de ABA 5 μM y EGTA 1 mM sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico en la raíz principal de la línea Col0::YC3.6 (**Figura 60**).

La aplicación simultánea de ABA y EGTA redujo los niveles de Ca^{2+} citosólico de las plántulas con déficit de B de una forma similar a la observada cuando se añadió exclusivamente EGTA (**Figuras 60D,H,B,F y 58D,H,B,F**).

La aplicación conjunta de estos compuestos no alteró el desarrollo de pelos radicales en las plántulas sometidas a deficiencia de B tras 6 y 24 h (**Figura 61D,H,B,F**). Sin embargo, en las plantas con B la adición de ABA y EGTA provocó la formación de pelos radicales (**Figura 61C,G,A,E**), al igual que ocurrió con el tratamiento de ABA (**Figura 57C,G,A,E**). Además, ambos compuestos redujeron el engrosamiento del ápice radical a las 24 h de déficit de B (**Figura 61H,F**), de forma similar a la observada con EGTA solo (**Figura 59H,F**).

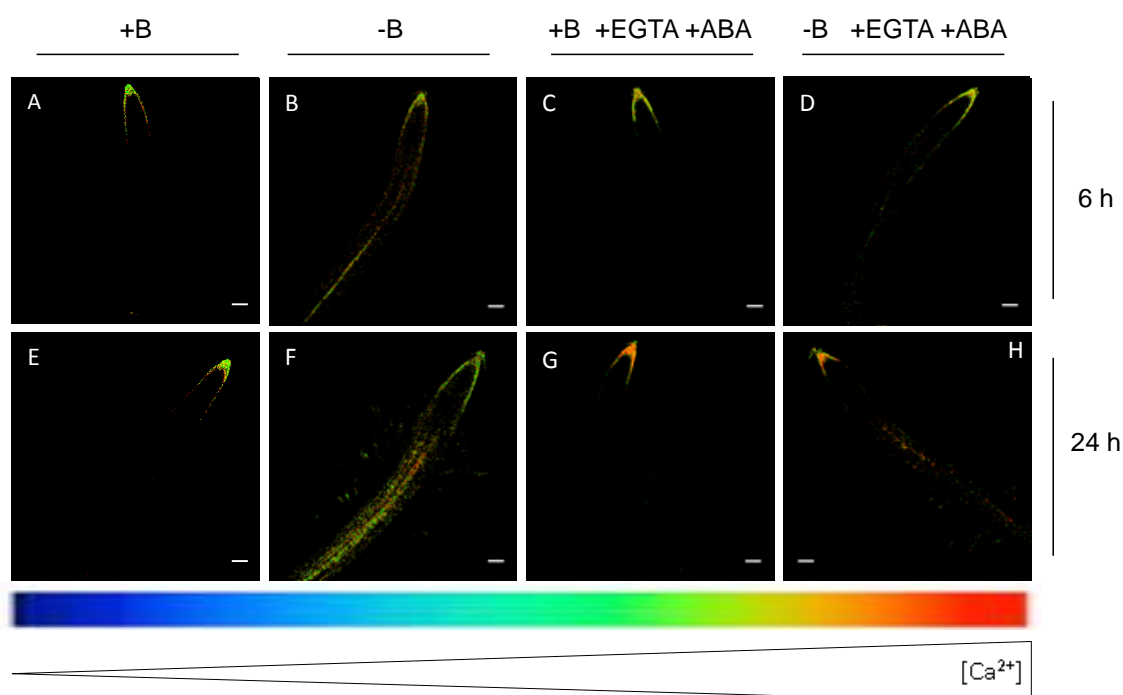


Figura 60. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabisopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μM y EGTA 1 mM. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μm .

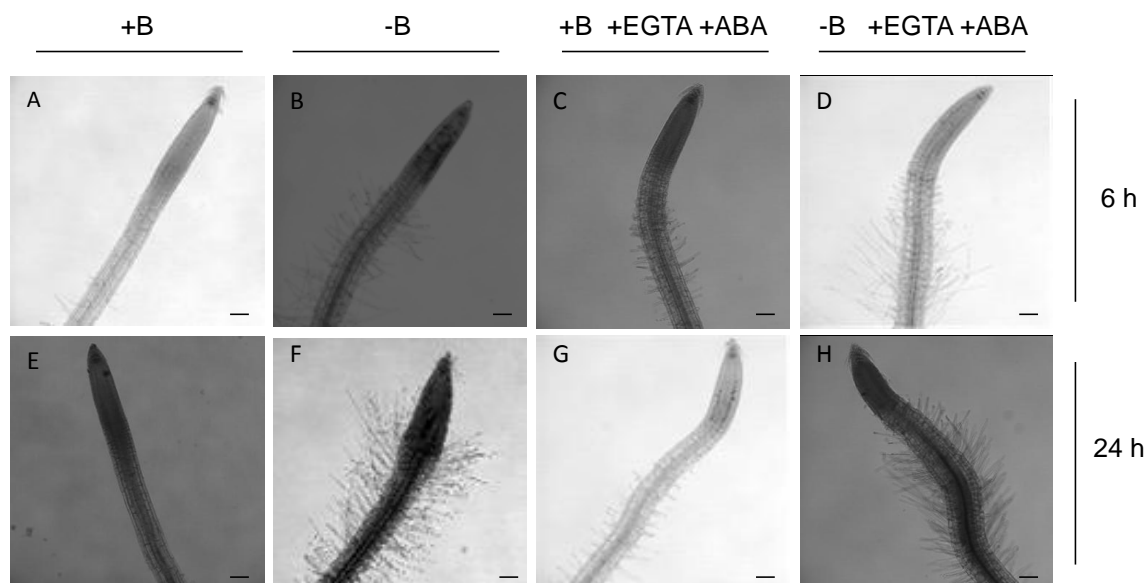


Figura 61. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de *arabidopsis* tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de ABA 5 μ M y EGTA 1 mM. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

III.4.1.6. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de U73122

Además, se estudió el efecto del U73122 5 μ M sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico en la raíz principal de plántulas de Col0::YC3.6 sometidas a deficiencia de B durante 6 y 24 h (**Figura 62**).

Los resultados mostraron que el U73122 provocó un notable aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico en ambos tratamientos de B a las 6 y a las 24 h (**Figura 62 C,D,G,H**).

En el análisis de la morfología de la raíz principal se observó que la aplicación de U73122 5 μ M impidió el desarrollo de pelos radicales y el engrosamiento del ápice en las plántulas deficientes en B (**Figura 63H,F**). Este efecto se observó principalmente a las 24 h de tratamiento.

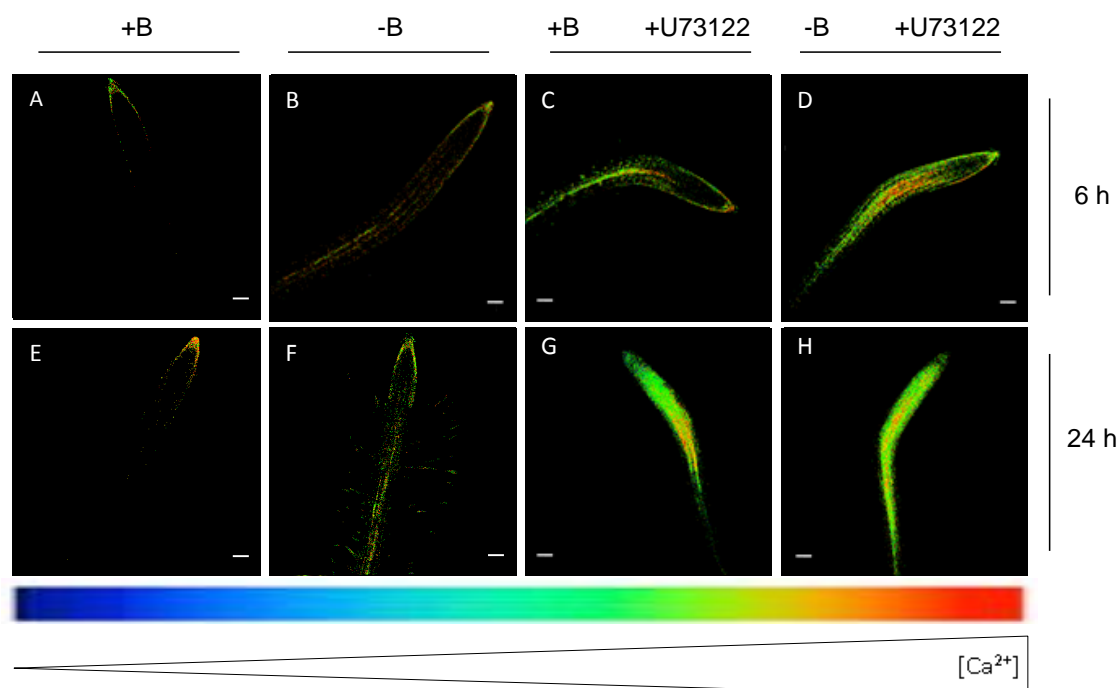


Figura 62. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 5 μ M. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

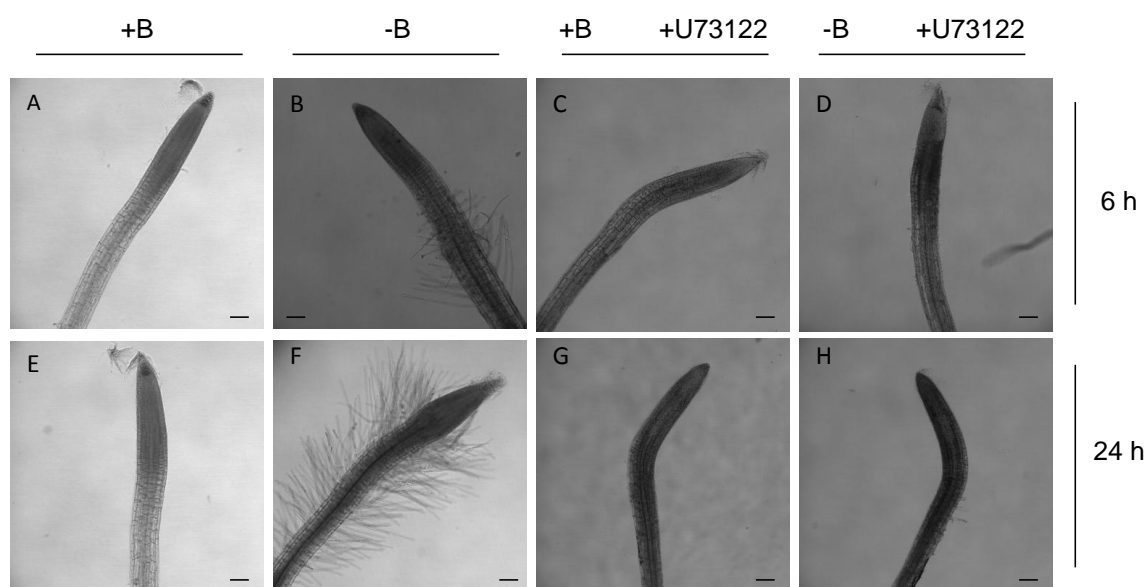


Figura 63. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 5 μ M. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

Puesto que hubo un gran incremento de fluorescencia en presencia de U73122 5 μM en ambos tratamientos de B (**Figura 62G,H**), se repitió el experimento con este compuesto a una concentración 1 μM con el objetivo de encontrar posibles diferencias entre las dos condiciones de B (**Figura 64**).

La presencia de U73122 1 μM apenas provocó diferencias entre los niveles de Ca^{2+} citosólico en la raíz principal de las plántulas deficientes en B durante 6 y 24 h en comparación con las del mismo tratamiento de B en ausencia de U73122 (**Figura 64D,H,B,F**).

El tratamiento con U73122 1 μM causó una menor formación de pelos radicales en las plántulas sometidas a déficit de B durante 6 y, especialmente, 24 h (**Figura 65D, H,B,F**). A diferencia del tratamiento con U73122 5 μM en deficiencia de B (**Figura 63H,F**), una concentración de 1 μM este compuesto no impidió el engrosamiento del ápice (**Figura 65H,F**).

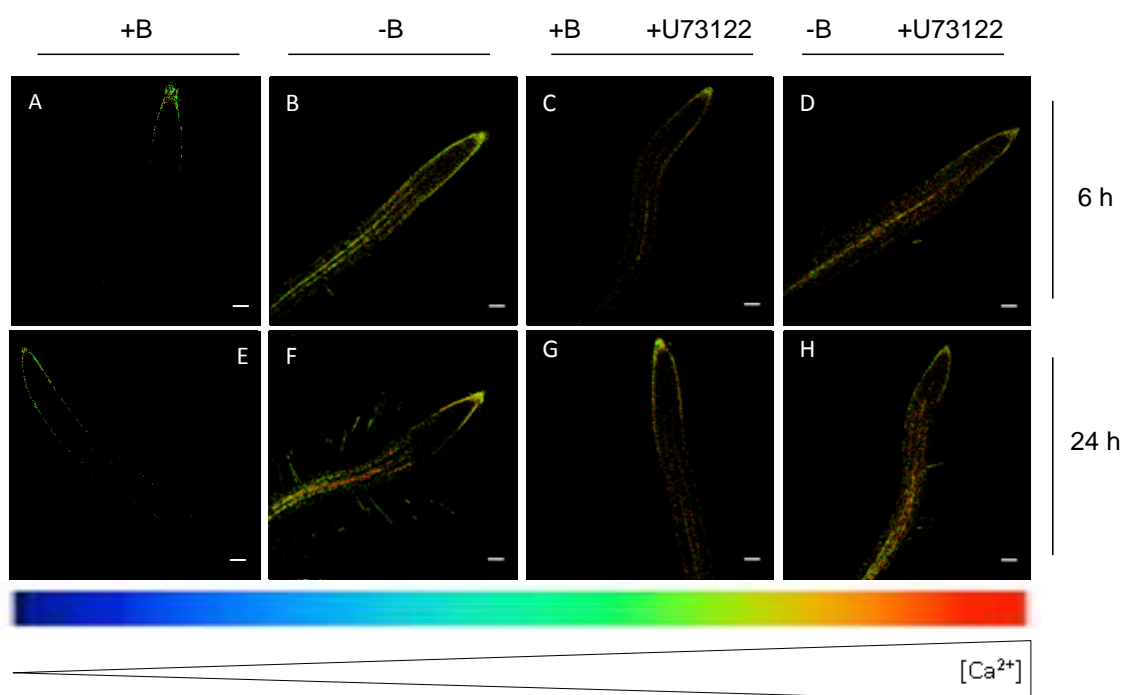


Figura 64. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de *arabidopsis* tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μM . Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μm .

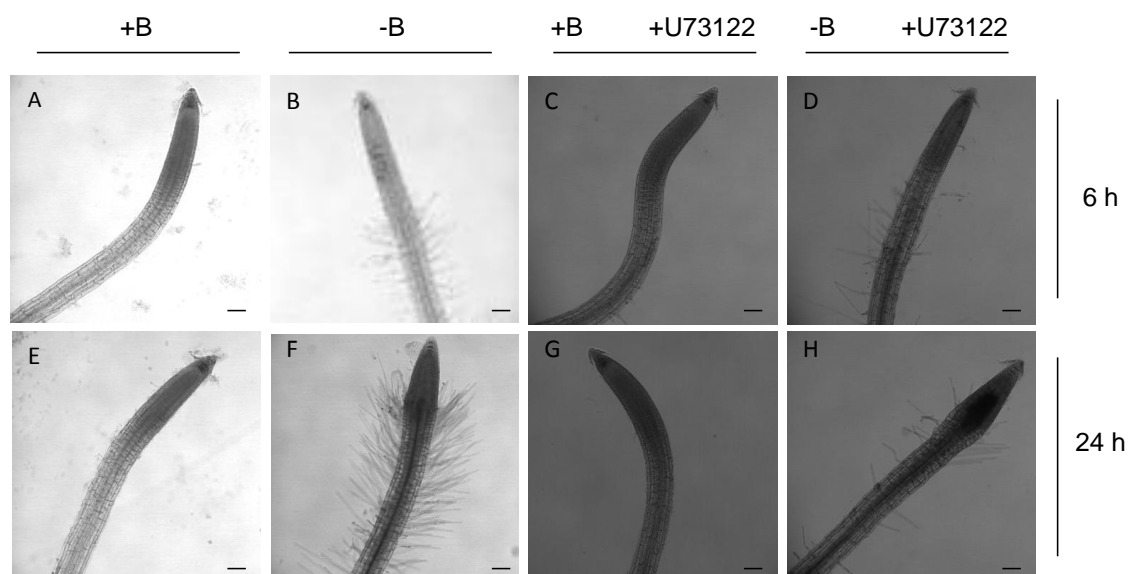


Figura 65. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de *arabidopsis* tratadas con B 2 μ M (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μ M. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μ m.

III.4.1.7. Genotipo Col0::YC3.6 en presencia de U73122 y EGTA

Finalmente, se estudió el efecto del U73122 1 μ M y EGTA 1 mM sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico en la raíz principal de plántulas de Col0::YC3.6 sometidas a deficiencia de B durante 6 y 24 h (**Figura 66**).

La adición simultánea de estos compuestos redujo los niveles de fluorescencia en las raíces de las plántulas deficientes en B (**Figura 66D,H,B,F**).

La presencia de U73122 y EGTA mantuvo el engrosamiento del ápice y redujo el desarrollo de pelos radicales de las plántulas tratadas con B limitante durante 24 h (**Figura 67H,F**), al igual que lo observado con la adición de U73122 1 μ M (**Figura 65H,F**).

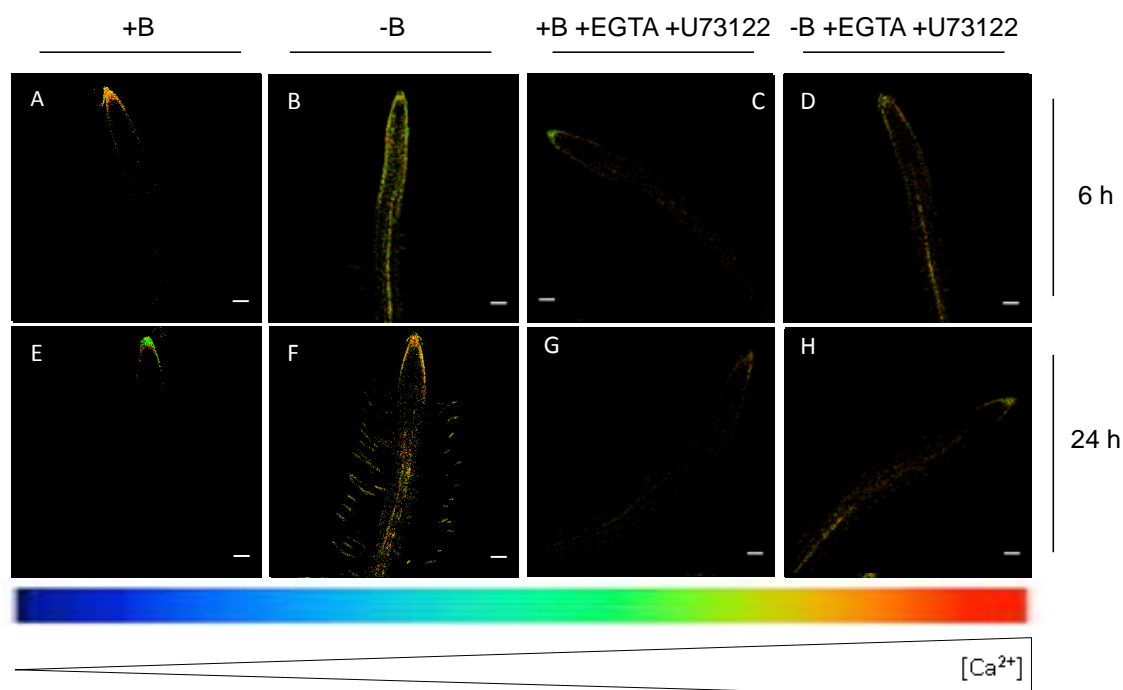


Figura 66. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabisopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μM y EGTA 1 mM. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μm .

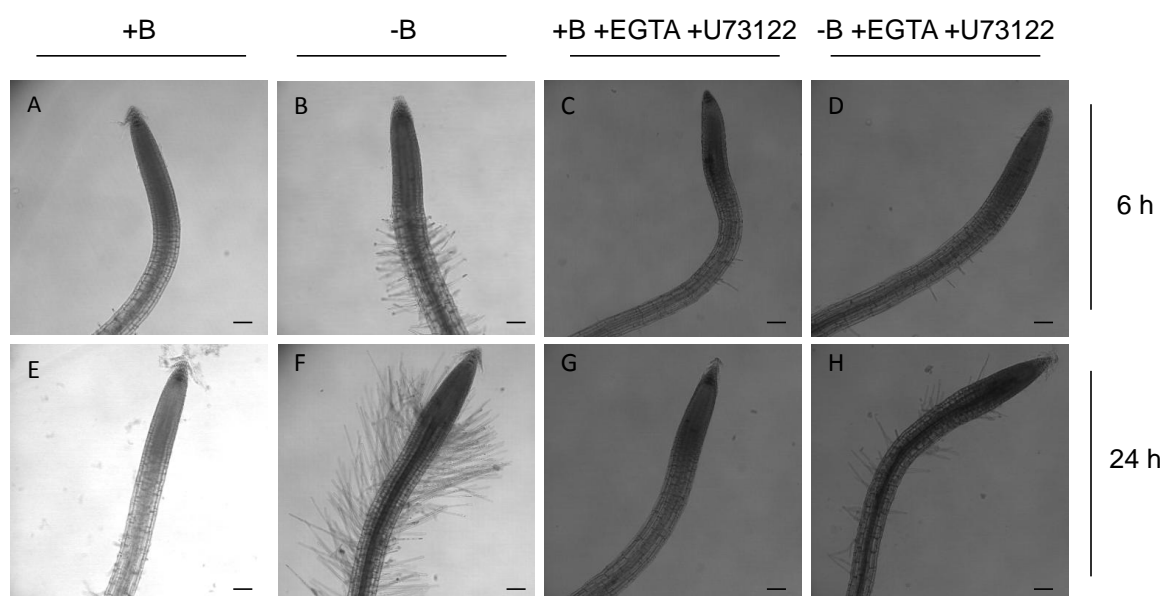


Figura 67. Efecto de la deficiencia de B sobre la morfología de la raíz principal en plántulas de arabisopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H), durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H), en presencia (C, D, G, H) o no (A, B, E, F) de U73122 1 μM y EGTA 1 mM. Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 100 μm .

III.4.2. Análisis de los niveles de calcio citosólico en el genotipo Col0::YC3.6 mediante microscopia de epifluorescencia

Para confirmar que el incremento observado en los niveles de Ca^{2+} citosólico como consecuencia del déficit de B era independiente de la metodología empleada para su estudio, las plántulas de Col0::YC3.6 deficientes en B también se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia (**Figura 68**).

Se observó que tras 6 y 24 h de deficiencia en B se produjo un aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico en comparación con el mismo tratamiento de suficiencia de B (**Figura 68**).

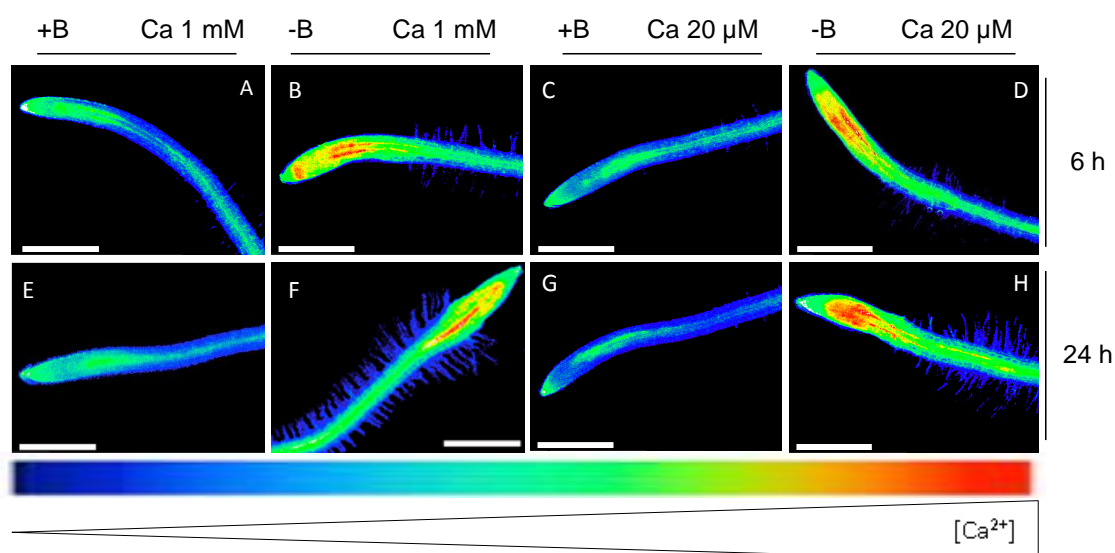


Figura 68. Efecto de la deficiencia de B sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico de la raíz principal en plántulas de arabidopsis tratadas con B 2 μM (A, C, E, G) o en deficiencia de B (B, D, F, H) durante 6 (A, B, C, D) o 24 h (E, F, G, H). Las imágenes son representativas de, al menos, dos experimentos independientes en los que se analizaron más de 20 plántulas en cada uno. Escala: 250 μm .

III.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ACA10, CAX3 Y CNGC19 EN EL GENOTIPO SILVESTRE MEDIANTE WESTERN-BLOT

Se realizaron unos análisis preliminares de expresión de proteínas en las raíces del genotipo Col-0 empleando anticuerpos específicos para las proteínas ACA10, CAX3 y CNGC19, que están implicadas en el transporte de Ca^{2+} .

El tamaño de banda obtenida para la proteína ACA10 (35 kDa) no se correspondió con el esperado (117 kDa) (**Figura 69A**), lo cual puede deberse a un truncamiento de la proteína durante su proceso de extracción y purificación. Sin embargo, el tamaño obtenido para CAX3 (45 kDa) fue solo ligeramente inferior al esperado (50 kDa) (**Figura 69B**). Finalmente, para la proteína CNGC19 se obtuvo un tamaño de banda que se correspondió con el esperado (85 kDa) (**Figura 69C**).

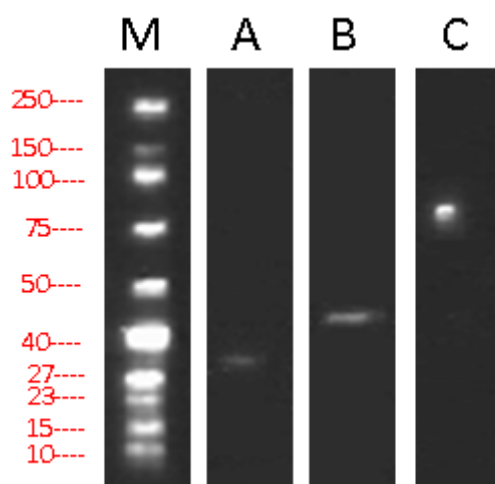


Figura 69. Análisis de los niveles de la proteína ACA10 (A), CAX3 (B) y CNGC19 (C) en las raíces de plántulas de arabidopsis cultivadas con B 2 μM . El tamaño de las bandas está expresado en kDa. M: marcador de masa molecular.

IV. DISCUSIÓN

IV.1. LA DEFICIENCIA EN BORO AFECTA A LA EXPRESIÓN DE GENES EN LAS RAÍCES DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS

En los últimos años varios estudios han demostrado que la deficiencia de B afecta a la expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo y desarrollo de las plantas (Reguera et al., 2009; Camacho-Cristóbal et al., 2011; Peng et al., 2012; Abreu et al., 2014). Así, por citar algunos ejemplos, la deficiencia de este nutriente afecta a los niveles de transcritos de genes relacionados con el estrés oxidativo (Kobayashi et al., 2004), respuestas a heridas (Koshiba et al., 2010), transporte de B (Miwa y Fujiwara, 2010), pared celular y membranas (Camacho-Cristóbal et al., 2008; Camacho-Cristóbal et al., 2011) y asimilación y fijación del nitrógeno (Beato et al., 2010, 2011 y 2014; Redondo-Nieto et al., 2012).

Estudios realizados previamente en nuestro grupo mediante microarrays mostraron que la deficiencia en B a corto plazo afectó a la expresión de genes implicados en la señalización de Ca^{2+} , transporte de B y de potasio y genes que codifican factores de transcripción en las raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Tabla 5A-D). Estos resultados fueron corroborados en esta tesis doctoral mediante la técnica Q-RT-PCR (Figuras 6-14) y el ensayo histoquímico de la enzima β -glucuronidasa (Figuras 36-40).

IV.1.1. Expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la señalización de calcio

La deficiencia de B afecta a diversos procesos fisiológicos y, por tanto, al desarrollo de las plantas (Brown et al., 2002; Goldbach y Wimmer, 2007; Camacho-Cristóbal et al., 2008b; Herrera-Rodríguez et al., 2010). Pese a ello, actualmente se desconocen los mecanismos a través de los cuales las plantas sienten la escasez de este micronutriente y cómo desencadenan una respuesta a este estrés. La alteración de la expresión de genes relacionados con la señalización de Ca^{2+} (Tabla 5 y Figuras 6-14) podría sugerir la hipótesis de que el calcio, como segundo mensajero, participase en el proceso de señalización de la disponibilidad de B. En la señalización mediada por

Ca^{2+} tienen lugar cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ controlados tanto espacial como temporalmente, en respuesta a estímulos específicos (Dodd et al., 2010).

Estos movimientos de Ca^{2+} están finamente controlados por transportadores y canales. Se ha propuesto que los canales no selectivos de cationes CNGC (“cyclic nucleotide gated ion channels”) están implicados en el transporte de Ca^{2+} hacia el citosol (Talke et al., 2003; Ma et al., 2009), y están involucrados en funciones fisiológicas como el crecimiento de la planta, la adaptación a elevadas concentraciones de Ca^{2+} y respuesta a estreses abióticos y bióticos (Clough et al., 2000; Kaplan et al., 2007; Chin et al., 2009; Dietrich et al., 2010; Zelman et al., 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que, en las raíces, la deficiencia de B provocó una notable sobreexpresión del gen *CNGC19* tras 6 y 24 h de tratamiento (**Tabla 5; Figura 6B**). Se ha descrito que este gen se sobreexpresa en la parte aérea de las plantas de arabidopsis sometidas a estrés salino (Kugler et al., 2009). Recientemente se ha descrito que el canal CNGC19 se localiza en la membrana vacuolar (tonoplasto) de las raíces de arabidopsis (Yuen y Christopher, 2013). No obstante, la mayoría de los miembros de la familia CNGC se ubican en la membrana plasmática (Dodd et al., 2010; Finka et al., 2012).

En el mutante *cngc19* la expresión diferencial de los genes analizados no se vio afectada por el déficit de B en comparación con el genotipo silvestre (**apartado III.1.4**). Este hecho podría explicarse por tres hipótesis. En primer lugar, porque la entrada de Ca^{2+} hacia el citosol desde el apoplasto tuviera mayor importancia que desde la vacuola; en segundo lugar, la función de CNGC19 podría estar siendo realizada por otro canal CNGC en este mutante como, por ejemplo, CNGC20, que también se localiza en la vacuola (Yuen y Christopher, 2013); y por último, la entrada de Ca^{2+} al citosol podría llevarse a cabo mediante otra familia de canales.

Los ACA (“autoinhibited Ca^{2+} -ATPases”) se encuadran dentro del grupo de transportadores de Ca^{2+} y participan en el mantenimiento de la homeostasis iónica y el transporte de Ca^{2+} fuera del citosol (Chan et al., 2010). Están involucrados en muchos procesos como el crecimiento del tubo polínico (Lucca et al., 2012), apertura y cierre estomáticos (Schielt y Palmgreen, 2005), adaptación a estreses abióticos y bióticos

(Quedeimata et al., 2008) y señalización por giberelinas (Chen et al., 1997). Los resultados obtenidos mostraron una sobreexpresión de los genes *ACA1* (24 h), *ACA10* (6 y 24 h), *ACA12* (6 h) y *ACA13* (6 y 24 h) tras el tratamiento de deficiencia de B en las raíces de *arabidopsis* (**Tabla 5A; Figura 7**). La localización de estos transportadores puede variar entre distintos compartimentos celulares; así, mientras que la proteína *ACA1* se localiza en el cloroplasto (Kabala y Klobus, 2005), *ACA10*, *ACA12* y *ACA13* están presentes en la membrana plasmática (Wang et al., 2011; Iwano et al., 2014; Limonta et al., 2014). Además, *ACA13* se localiza en las vesículas cercanas al aparato de Golgi en el tubo polínico (Iwano et al., 2014). Estudios previos en plantas de soja sometidas a salinidad mostraron la sobreexpresión de *ACA1* y el aumento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Chung et al., 2000). Estos resultados, junto con el incremento de la expresión del gen *ACA1* en las plántulas de *arabidopsis* bajo deficiencia de B (**Figura 7A**), apoyan su participación en el transporte de Ca^{2+} hacia el exterior celular para devolver la $[Ca^{2+}]_{cit}$ a niveles basales una vez producida la firma de Ca^{2+} en respuesta al estrés.

Los CAX (“cation exchangers”) son transportadores antiporte de Ca^{2+}/H^{+} que se localizan en el tonoplasto y transportan Ca^{2+} desde el citosol hacia la vacuola (Conn et al., 2011). *CAX3* se localiza en el tonoplasto de las raíces, así como en flores abiertas y silicuas (Cheng et al., 2005). La deficiencia de B provocó también la sobreexpresión de *CAX3* (**Tabla 5A; Figura 6A**) en las raíces de *arabidopsis*.

El conjunto de estos análisis de expresión génica sugieren que la deficiencia de B a corto plazo provocaría una alteración de la homeostasis del Ca^{2+} en las raíces de *arabidopsis* de tal manera que, como consecuencia del estrés nutricional, se produciría un aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ debido a la entrada de este catión en el citosol desde el exterior celular y la vacuola a través de canales tipo CNGC; posteriormente, se activaría la expresión de los transportadores *ACA* y *CAX* para retirar el exceso de este catión hacia el apoplasto y otros reservorios internos de las células (como la vacuola) y volver a los niveles basales de $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Quiles-Pando et al. 2013; González-Fontes et al., 2014).

Una vez que se ha desarrollado la firma de Ca^{2+} , la información contenida en ella debe ser transmitida en la célula mediante una serie de reacciones llevadas a cabo por

proteínas de unión a este catión, que actúan como sensores de Ca^{2+} . En esta transmisión intervienen las calmodulinas (CaM), proteínas similares a calmodulina (CML), proteínas similares a calcineurina B (CBL), que a su vez interaccionan de forma específica con otras quinasas denominadas CIPK ("CBL interacting protein kinases"), y las CPK ("calcium dependent protein kinases") (Hashimoto y Kudla, 2011).

En *arabidopsis* el grupo de las CML está formado por 50 miembros que presentan entre 2 y 6 dominios de unión a Ca^{2+} (McCormack y Braam, 2003; McCormack et al., 2005). La mayoría de las CML son citosólicas, aunque algunas pueden encontrarse unidas a membranas (Rodríguez-Concepción et al., 1999; Dong et al., 2002; McCormack y Braam, 2003). Los resultados obtenidos mostraron una sobreexpresión de los genes *CML11*, *CML12*, *CML23*, *CML24*, *CML30*, *CML37*, *CML45* y *CML47* tras el tratamiento con deficiencia de B a 6 y 24 h (**Tabla 5A; Figura 8**). Además, el ensayo histoquímico de la enzima β -glucuronidasa indicó que los genes *CML12* y *CML24* se sobreexpresaron en deficiencia de B en la zona de elongación y en el cilindro central de la zona de maduración (**Figuras 37B y 38B**). También se ha descrito la sobreexpresión de estos genes en respuesta a estímulos abióticos (Delk et al., 2005).

Las CBL son un grupo de pequeñas proteínas con capacidad de unión a Ca^{2+} que interaccionan con una familia de proteínas quinasas denominadas CIPK (Shi et al., 1999). Las proteínas CBL1, 4, 5 y 9 se localizan en la membrana plasmática (Batistic et al., 2008; Batistic et al., 2010; Held et al., 2011), mientras que CBL3 y 10 se encuentran en el tonoplasto (Batistic et al., 2010). Las CIPK presentan localización citosólica y nuclear (D'Angelo et al., 2006; Batistic et al., 2010). Los análisis por microarrays (**Tabla 5A**) mostraron una sobreexpresión de los genes *CBL1*, *CBL4* y *CBL5* y la represión de *CBL3*, *CBL9*, *CBL10* y *CIPK23* como consecuencia del tratamiento de 24 h con déficit de B; estos resultados fueron corroborados mediante análisis por Q-RT-PCR (**Figura 9**), excepto en el caso de *CIPK23*. En el caso del gen *CBL1* se ha descrito su inducción por otros estreses abióticos como la sequía y el frío (Kudla et al., 1999). Además, CBL1 y CBL9 pueden interaccionar con CIPK26 y formar el complejo CBL1-CBL9-CIPK26, que activa la NADPH oxidasa RBOHF con la consecuente generación de ROS (Drerup et al., 2013). La desregulación de los genes *CBL1* y *CBL9* en condiciones de deficiencia de B

podría alterar los niveles del complejo CBL1-CBL9-CIPK26 e incrementar los niveles de ROS. En relación con esto, se ha propuesto la participación de ROS en la inhibición del crecimiento de la raíz en plantas de *arabidopsis* con déficit de B (Camacho-Cristóbal et al., 2015).

Las CPK son un grupo de quinasas reguladas por Ca^{2+} . En *arabidopsis* existen 34 miembros de esta familia y su localización varía entre la membrana plasmática (Mehlmer et al., 2010), citoplasma (Dammann et al., 2003), asociadas al citoesqueleto (Putnam-Evans et al., 1989), al retículo endoplasmático (Lu et al., 2002) o a peroxisomas (Dammann et al., 2003). Entre los procesos fisiológicos regulados por CPK se encuentran el crecimiento radical y del tubo polínico (Estruch et al., 1994; Ivashuta et al., 2005; Gargantini et al., 2006; Yoon et al., 2006; Myers et al., 2009), la síntesis de ROS (Kobayashi et al., 2007) y la regulación de factores de transcripción dependiente de ABA (Zhu et al., 2007). Los resultados indicaron la sobreexpresión de los genes *CPK1*, *CPK28* y *CPK29* como consecuencia del tratamiento de 6 y 24 h con déficit de B en las raíces de *arabidopsis* (**Tabla 5A y Figura 10**). *CPK1* puede fosforilar a *ACA2* inhibiendo su actividad (Hwang et al., 2000), la cual puede ser activada mediante la unión de una calmodulina (Harper et al., 1998). De forma similar, *CPK28*, cuyo gen se sobreexpresa en deficiencia de B (**Figura 10**), podría regular la actividad de *ACA1*, *ACA10*, *ACA12* o *ACA13* para regular la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en la ruta de señalización asociada al déficit de B. La expresión de *CPK28* se localizó en la zona de elongación de la raíz (**Figura 39A,B**), que coincide con las observaciones realizadas por Matschi et al. (2013), y, además, en condiciones de deficiencia de B se expresó en el cilindro central (**Figura 39B**).

Además de los sensores de Ca^{2+} mencionados anteriormente, existen otras familias de proteínas cuyos miembros son capaces de unirse a este catión y regular así su actividad y localización. Un ejemplo sería la familia de las anexinas, un grupo de proteínas dependientes de Ca^{2+} y de unión a lípidos (Gerke y Moss, 2002). Las anexinas participan en la regulación de las respuestas a la sequía y salinidad (Huh et al., 2010), señalización por ABA (Lee et al., 2004) y regulación de la firma de Ca^{2+} generada por ROS en la raíces (Richards et al., 2014). Los resultados obtenidos mostraron una

sobreexpresión del gen *ATANN2* tras 24 h de deficiencia de B (**Tabla 5A y Figura 11A**). Se sabe que este gen se reprime tras la adición de peróxido de hidrógeno en las raíces de *arabidopsis* (Richards et al., 2014), lo cual podría indicar su participación en la transmisión de la señal de deficiencia de B mediante la generación de ROS (Oiwa et al., 2013; Camacho-Cristóbal et al., 2015).

Por último, los resultados indicaron la sobreexpresión del gen *PBP1* tras 6 y 24 h de déficit de B (**Tabla 5A y Figura 11B**), el cual codifica una proteína con varios dominios de unión a Ca^{2+} cuya expresión se induce por auxinas (Benjamins et al., 2003). Interesantemente se ha descrito que la deficiencia de B causa un incremento en los niveles de auxinas en las raíces de *arabidopsis* (Martín-Rejano et al., 2011; Camacho-Cristóbal et al., 2015), lo cual apoyaría la participación de Ca^{2+} y auxinas en la ruta de transmisión de la señal de déficit de B.

IV.1.2. Expresión de genes que codifican factores de transcripción

La mayoría de los genes asociados a la regulación del desarrollo de las plantas codifican factores de transcripción que controlan la expresión de otros genes diana (Kaufmann et al., 2010). En general, los factores de transcripción están compuestos de un dominio de unión a DNA y otro activador/represor, que actúan juntos para regular muchos procesos fisiológicos y bioquímicos modulando la tasa de iniciación de la transcripción de genes diana (Ptashne, 1988).

Los resultados obtenidos mostraron que la deficiencia de B afectó a la expresión de genes que codifican factores de transcripción pertenecientes a las familias MYB, WRKY, bZIP y GATA (**Tabla 5D y Figura 14**).

Los factores de transcripción tipo MYB participan en la regulación de una gran variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos como, por ejemplo, la morfogénesis celular (Payne et al., 1999), la respuesta a estreses (Nagaoka y Takano, 2003) y la señalización por hormonas (Newman et al., 2004). El tratamiento con déficit de B provocó la sobreexpresión de los genes *MYB14*, *MYB15* y *MYB78* (**Tabla 5D y Figura 14C,D**). Esta sobreexpresión de *MYB15* se observó en la zona de elongación y en el

cilindro central de las raíces (**Figura 40B**). Otros estreses (frío y salinidad) y el ácido abscísico sobreexpresan este gen y tienen en común el incremento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ como iniciador de la respuesta en la planta (Agarwal et al., 2006; Jiang y Deyholos, 2006; Ding et al., 2009).

La familia de factores de transcripción denominada WRKY interviene en procesos relacionados con el desarrollo (Alexandrova y Conger, 2002; Lagacé y Matton, 2004) y la defensa frente a estreses abióticos (Fowler y Thomashow, 2002; Pnueli et al., 2002; Seki et al., 2002). Los resultados mostraron la sobreexpresión de los genes *WRKY38*, *WRKY40* y *WRKY46* tras el tratamiento de deficiencia de B (**Tabla 5D y Figura 14F**). La expresión de *WRKY40* se induce por el tratamiento con ABA y por la salinidad y sequía (Chen et al., 2010). La expresión de *WRKY46* también se activa en respuesta a la sequía, salinidad y ROS (Ding et al., 2014). Por tanto, este factor de transcripción también podría participar a través de la producción de ROS en la ruta de transmisión de la señal de déficit de B (Camacho-Cristóbal et al., 2015).

En *arabidopsis* se han descrito 29 miembros de la familia de factores de transcripción GATA que están implicados en diversos procesos del desarrollo (Shikata et al., 2004; Zhao et al., 2004; Liu et al., 2005). Los resultados mostraron la represión del gen *GATA4* en deficiencia de B (**Tabla 5D; Figura 14E**). Existen datos de que este factor de transcripción puede regular la expresión de genes relacionados con la estructura de la pared celular, como expansinas y proteínas arabinogalactano (Manfield et al., 2007). Curiosamente, la deficiencia de B provoca la represión de genes pertenecientes a estas familias (*EXP14* y *EXPB1*; *AGP13* y *AGP14*) en las raíces de *arabidopsis* (Camacho-Cristóbal et al., 2008), por lo que podría establecerse una relación entre la represión de la expresión del factor de transcripción *GATA4* y los efectos sobre la estructura de la pared celular en las raíces de plantas de *arabidopsis* sometidas a deficiencia de B.

Se sabe que la interacción entre los sensores de Ca^{2+} y los factores de transcripción es un paso necesario en la regulación de genes diana de diferentes rutas de señalización (Kim et al., 2009; Galon et al., 2010; Reddy et al., 2011). Por ejemplo, la proteína CML12 es capaz de unirse a factores de transcripción pertenecientes a las

familias MYB, WRKY y bZIP (Popescu et al., 2007); otros estudios han demostrado la regulación de la actividad de diferentes factores de transcripción a través de una interacción directa con calmodulinas (Kim et al., 2009; Galon et al., 2010) o CPK (Choi et al., 2005; Zhu et al., 2007). Estos resultados en conjunto podrían sugerir que la deficiencia de B estaría afectando a la expresión de genes diana mediante la alteración de la señalización por Ca^{2+} , en la cual la interacción entre los sensores de Ca^{2+} y los factores de transcripción sería un paso fundamental.

IV.2. LA DEFICIENCIA EN BORO ALTERA LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO CITOSÓLICO EN LA RAÍZ PRINCIPAL DE ARABIDOPSIS

Las construcciones “Yellow Cameleons” (YC), junto con el empleo de la microscopía de fluorescencia (confocal y epifluorescencia), han permitido monitorizar los cambios en las dinámicas de Ca^{2+} (Choi et al., 2014; Thor y Peiter, 2014; Behera et al., 2015; Keinath et al., 2015).

En este trabajo se empleó la línea reportera Col0::YC3.6, la cual expresa de forma estable la construcción UbiQ10:YC3.6-bar#22-2 en el citosol (Krebs et al., 2012), con el fin de determinar si la deficiencia en B a corto plazo afecta realmente a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en las raíces de plántulas de arabidopsis.

IV.2.1. Efecto de la deficiencia en boro sobre la concentración de calcio citosólico

Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal y de epifluorescencia mostraron que tras 6 y 24 h de déficit de B tuvo lugar un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en la raíz principal (**Figuras 50B,D y 68B,F**), en comparación con el tratamiento de suficiencia (**Figuras 50A,C y 68A,E**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Koshiba et al. (2010), según los cuales el tratamiento con deficiencia de B provoca un aumento en la entrada de Ca^{2+} hacia el citosol en las células BY-2 de tabaco. Además, la deficiencia de B provocó una notable sobreexpresión del gen *cngc19* (**Figura 6**). Estos resultados sugieren la posible intervención de este canal en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en

respuesta a la deficiencia de B. Así este catión actuaría como segundo mensajero en la transmisión de la señal de déficit de B.

Para confirmar que el efecto observado sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico era consecuencia de la alteración de la disponibilidad de B, se llevó a cabo un experimento de reversión con plántulas de la línea Col0::YC3.6. Plántulas sometidas a un tratamiento previo de déficit de B durante 24 h sufrieron una reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ al ser transferidas a un medio con suficiencia de B (**Figura 52E-H**). Estos resultados son coherentes con lo descrito por Koshiba et al. (2010).

IV.2.2. Efecto de la deficiencia en boro sobre la concentración de calcio citosólico en presencia de compuestos que afectan la homeostasis del calcio

Se analizó mediante microscopia confocal el efecto de diferentes compuestos que alteran la homeostasis de Ca^{2+} (ABA, EGTA y U73122) para determinar si el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ estaría causado por una entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular, por su liberación desde reservorios internos de la célula o por ambos.

El ABA tiene un papel fundamental en el control estomático y en la respuesta frente a diferentes estreses, en los que el Ca^{2+} es un componente esencial en la ruta de transducción de señales asociada a esta fitohormona (Hong et al., 2013). Recientemente se ha descrito que el ABA provoca un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en las raíces de arabidopsis (Jiao et al., 2013).

El tratamiento con ABA 5 μM durante 6 y 24 h causó un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tanto en las plántulas procedentes del tratamiento con suficiencia de B (**Figura 56C,G**) como en aquellas sometidas a déficit (**Figura 56D,H**), en comparación con el tratamiento control en ausencia de ABA (**Figura 56A,B,E,F**). Estos hechos confirmarían los resultados previos obtenidos por Jiao et al. (2013). El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ como consecuencia de la presencia de ABA fue mayor en las plántulas sometidas a deficiencia de B que en las tratadas con suficiencia, lo cual apoyaría la hipótesis de que la deficiencia de B provoca la apertura de canales de Ca^{2+} facilitando su entrada en el citosol (Koshiba et al., 2010; Quiles-Pando et al., 2013).

El tratamiento con ABA provocó una notable sobreexpresión del gen *CAX3* que fue significativamente mayor con deficiencia de B (**Figura 30B**). Puesto que *CAX3* transporta Ca^{2+} desde el citosol hacia la vacuola (Conn et al., 2011) y que el ABA causa un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (**Figura 56**; Jiao et al., 2013), su sobreexpresión génica podría estar implicada en la restauración de los niveles basales de Ca^{2+} .

Los resultados con el quelante EGTA mostraron que no hubo diferencias en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ entre las plántulas sometidas o no a deficiencia de B (**Figura 58**). En plantas de té, la incorporación de hierro promovida por un tratamiento con aluminio es un proceso mediado por la entrada de Ca^{2+} extracelular al citosol y la presencia de EGTA bloquea dicho proceso por la quelación del Ca^{2+} (Zhang et al., 2015). Estos resultados indicarían que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debido al tratamiento con deficiencia de B estaría causado principalmente por la entrada de Ca^{2+} procedente del apoplasto.

El tratamiento simultáneo con ABA y EGTA redujo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de las plántulas con déficit de B de una forma similar a la observada cuando se añadió exclusivamente EGTA (**Figuras 60 y 58**). Se ha descrito que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ observado en las raíces de plantas de *arabidopsis* tratadas con ABA se redujo parcialmente debido a la presencia de EGTA (Jiao et al., 2013). Estos resultados apoyarían que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debido al déficit de B se debería fundamentalmente a una entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular.

El siguiente compuesto ensayado fue el U73122, que altera la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ bloqueando su liberación desde reservorios intracelulares (vacuola y retículo endoplasmático) (Andreeva et al., 2010). Los resultados mostraron que las plántulas sometidas a deficiencia de B durante 6 y 24 h en presencia de U73122 1 μM (**Figura 64D,H**) tuvieron una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ similar a la de aquellas tratadas sin B y sin U73122 (**Figura 64B,F**). Recientemente se ha demostrado que el Ca^{2+} participa en la ruta de señalización de nitrato en las raíces de plantas de *arabidopsis* (Riveras et al., 2015). En este estudio se observó que el cambio de amonio a nitrato como fuente de nitrógeno provocó un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$; para comprobar que esta entrada de Ca^{2+} en el citosol procedía de reservorios internos, emplearon el compuesto U73122 que inhibió el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Riveras et al., 2015). Por tanto, el hecho de que la

presencia de U73122 no impida el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$, que tiene lugar bajo deficiencia de B, sería una prueba más de que la respuesta a este estrés nutricional provoca principalmente una entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular. De hecho, el tratamiento simultáneo con U73122 y EGTA (**Figura 66D,H,B,F**) redujo la $[Ca^{2+}]_{cit}$ de las plántulas con déficit de B de una forma similar a la observada cuando se añadió exclusivamente EGTA (**Figura 58D,H,B,F**), lo cual apoya la conclusión anterior.

El tratamiento con U73122 5 μ M provocó la sobreexpresión de todos los genes estudiados, excepto *CBL4*, *CBL9* y *bZIP34* (**Figuras 33-35**). Estos resultados sugieren que este aminoesteroide a una concentración 5 μ M causa una severa desregulación génica.

IV.2.3. Efecto de la deficiencia en boro sobre la concentración de calcio citosólico en la raíz principal de diferentes mutantes

Se estudió el efecto de la mutación de algunos de los genes cuya expresión se vio alterada por este estrés nutricional sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en la raíz principal.

El mutante *cbl1/4/5/9::YC3.6* en condiciones de deficiencia en B no mostró ninguna señal de fluorescencia (**Figura 54H**). Está descrito que CBL1, 4, 5 y 9 participan en la decodificación de la firma de Ca^{2+} (Shi et al., 1999). Como ya se mencionó anteriormente, CBL1 y CBL9 pueden formar un complejo con CIPK26 que activa la NADPH oxidasa RBOHF implicada en la producción de ROS (Drerup et al., 2013). Por tanto, estos resultados sugieren que el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ asociado al déficit de B requeriría la formación previa de ROS, la cual no se estaría dando en el mutante *cbl1/4/5/9::YC3.6*. Estos datos son consistentes con una posible relación entre ROS y Ca^{2+} en la transmisión de la señal de deficiencia de B (Camacho-Cristóbal et al., 2015). En relación con esto, el aumento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en la células BY-2 de tabaco sometidas a déficit de B se redujo en un 80 % en presencia de DPI (Koshiba et al., 2010), compuesto que inhibe la actividad NADPH oxidasa (Andronis et al., 2014).

En el mutante *cax3* hubo una considerable caída de fluorescencia en deficiencia de B en comparación con el genotipo silvestre (**Figura 54F,B**). La menor expresión del

gen *CBL1* en el genotipo *cax3* podría explicar la menor $[Ca^{2+}]_{cit}$ de este mutante (**Figura 16A**).

En los mutantes *cpk28::YC3.6* y *cpk29::YC3.6* no hubo un incremento en los niveles de fluorescencia bajo deficiencia de B en comparación con el genotipo Col0::YC3.6 (**Figura 54N,O,B**). Esto podría indicar su participación en la activación de los canales responsables de la entrada de Ca^{2+} hacia el citosol mediante procesos de fosforilación y, posteriormente, en la transmisión de la señal de déficit de B. En este sentido, está descrita que la activación del canal de aniones SLAC1 por Ca^{2+} requiere su fosforilación por CPK21 y CPK23 para promover el cierre estomático (Geiger et al., 2010). Por tanto, la sobreexpresión de los genes *CPK28* y *CPK29* en el genotipo silvestre estaría relacionada con el incremento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ como consecuencia del tratamiento con déficit de B (**Figura 10**). Estas CPK podrían participar en la transmisión de la señal de esta deficiencia nutricional mediante la fosforilación de proteínas diana, como canales y sensores de Ca^{2+} y factores de transcripción, entre otros.

También en los mutantes *bzip34::YC3.6*, *gata4::YC3.6* y *myb15::YC3.6* no hubo un aumento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ con déficit de B en comparación con el genotipo Col0::YC3.6 (**Figura 54Q,S,U,B**); estos factores de transcripción podrían estar participando en la ruta de señalización mediada por Ca^{2+} como consecuencia del déficit de B. En este proceso intervendrían las CaM/CML que pueden regular la actividad de diferentes factores de transcripción pertenecientes a las familias bZIP, MYB y WRKY (Popescu et al., 2007; Galon et al., 2008; González-Fontes et al., 2013).

IV.3. LA DEFICIENCIA EN BORO AFECTA AL PERFIL IÓNICO EN LAS RAÍCES DE ARABIDOPSIS

Con el objetivo de determinar si existe una relación entre el déficit de B y la concentración de otros iones en las raíces de arabidopsis se midió el contenido de B, Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , K^+ y Na^+ .

IV.3.1. Concentración de boro soluble, insoluble y total

Los resultados mostraron que como consecuencia del tratamiento con deficiencia de B durante 24 h se redujo la concentración de B soluble, insoluble y total en las raíces de plantas de los genotipos silvestre y Col0::YC3.6 en comparación con el tratamiento de suficiencia de B (**Figura 41**). Estos resultados coinciden con los obtenidos en las plantas de tabaco (Camacho-Cristóbal et al., 2005), y es consistente con la sobreexpresión de los genes *BOR1* y *NIP5;1* en condiciones de déficit de B (**Tabla 5B y Figura 12A,B**) (Takano et al., 2002 y 2006). Así, *BOR1* participa en la carga de B en el xilema cuando este nutriente es limitante (Takano et al., 2002). *NIP5;1* es un canal de ácido bórico localizado en la membrana plasmática de las células de la raíz que participa en la incorporación de B cuando también es limitante (Takano et al., 2006). Por tanto, en respuesta a este estrés nutricional se activaría la expresión de estos transportadores para incorporar la mayor cantidad de B posible desde el suelo y movilizarlo posteriormente a las partes aéreas de la planta.

Es destacable el hecho de que en el mutante *cax3* la expresión del gen *BOR1* fue menor que en el genotipo silvestre a las 24 h de deficiencia de B (**Figura 18A**). Esto supondría que la carga de B al xilema estaría afectada en el mutante *cax3* (Takano et al., 2002), y se correspondería con el hecho de que *cax3* presente una reducción del peso fresco del vástago en comparación con el organismo silvestre (Cheng et al., 2005).

IV.3.2. Concentración de Ca^{2+}

En la raíces de tabaco la deficiencia en B provocó un aumento estadísticamente no significativo en la concentración de Ca^{2+} (Camacho-Cristóbal et al., 2005). Los resultados del presente trabajo con las raíces de *arabidopsis* no mostraron diferencias significativas en la concentración de Ca^{2+} entre ambos tratamientos de B (**Figura 42**). No obstante, estos análisis no discriminan entre las muy bajas concentraciones Ca^{2+} citosólico y las de otros reservorios, incluido el apoplasto.

La concentración Ca^{2+} se vio alterada por la deficiencia de B en las raíces de las plántulas de los mutantes *aca10* y *cax3*. En *aca10*, el tratamiento de 24 h de déficit de

B provocó un aumento en la concentración Ca^{2+} (**Figura 42**). Este efecto sería consistente con la actividad de ACA10 que transporta Ca^{2+} hacia el exterior celular (Wang et al., 2011). Por tanto, el Ca^{2+} que entraría en las células radicales de *aca10* a favor de su gradiente de potencial electroquímico probablemente quedaría confinado en los reservorios de Ca^{2+} intracelulares. Sin embargo, en el mutante *cax3* la concentración de Ca^{2+} se redujo con la deficiencia de B (**Figura 42**). Puesto que CAX3 transporta Ca^{2+} al interior de la vacuola (Conn et al., 2011), su ausencia estaría provocando que este catión fuera principalmente excretado hacia el exterior celular a través de las bombas de Ca^{2+} .

La expresión de *CNGC19* en el genotipo silvestre fue mayor que en el mutante *cax3* tras 24 h de déficit de B (**Figura 15B**). Como se acaba de mencionar, la función de CAX3 reside en el transporte de Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior de la vacuola (Conn et al., 2011). Por tanto, sería de esperar que en el mutante *cax3* hubiera una menor participación de CNGC19 dado que en este mutante la concentración de Ca^{2+} vacuolar sería menor.

IV.3.3. Concentración de Mg^{2+}

Estudios previos mostraron que la concentración de Mg^{2+} fue ligeramente mayor en las raíces de tabaco sometidas a deficiencia de B, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Camacho-Cristóbal et al., 2005). Sin embargo, la deficiencia en B redujo la concentración de Mg^{2+} en las raíces de los mutantes de *arabidopsis* *cb1/4/5/9* y *cax3* (**Figura 43**). Está descrita la participación de diferentes CBL y CIPK en la regulación del transporte de este catión desde el citosol hacia la vacuola (Tang et al., 2014). Además, se ha propuesto la intervención de las proteínas CAX en el transporte no solo de Ca^{2+} , sino también de Mg^{2+} y cobre en las plantas de arroz (Yamada et al., 2014). El hecho de que en ambos mutantes se produzca una disminución en la concentración de Mg^{2+} tras el tratamiento con déficit de B sugeriría que estas proteínas estarían implicadas en la homeostasis del Mg^{2+} bajo este estrés nutricional.

IV.3.4. Concentración de K⁺

Los mutantes *cb1/4/5/9* y *cax3* tuvieron una concentración de K⁺ significativamente menor en deficiencia de B a diferencia del genotipo silvestre (**Figura 45**). Sin embargo, los niveles de K⁺ en Col-0 fueron claramente mayores que en el mutante *cb1/4/5/9* en ambos tratamientos de B (**Figura 45**). CBL1 unido a CBL9 pueden interaccionar con CIPK23 formando el complejo CBL1-CBL9-CIPK23, el cual activa al canal de baja afinidad de K⁺ AKT1 ("arabidopsis K⁺ transporter 1") en la membrana plasmática de la epidermis y córtex de las raíces de arabidopsis en condiciones de deficiencia de K⁺, permitiendo la incorporación de este catión (Li et al., 2006; Xu et al., 2006). Esta regulación podría explicar que el mutante *cb1/4/5/9* tenga una menor concentración de K⁺ que Col-0. Interesantemente, los genes *CBL1*, *CBL4* y *CIPK23* en el mutante *cax3* tuvieron una menor expresión con respecto al genotipo silvestre en condiciones de déficit de B (**Figura 16A,B,D**). Estos datos de expresión se podrían relacionar con la menor concentración de K⁺ en el mutante *cax3* en deficiencia de B (**Figura 45**).

El canal SKOR ("stelar K⁺ outward rectifier") juega un papel fundamental en el transporte de K⁺ desde la raíz hacia el xilema (Liu et al., 2006). El gen *SKOR* se sobreexpresó en el mutante *cax3* en deficiencia de B en comparación con el genotipo silvestre (**Figura 19C**). Dado que SKOR está implicado en la carga de K⁺ en el xilema (Wegner y Raschke, 1994; Gaymard et al., 1998), esta sobreexpresión se podría relacionar con la reducción en los contenidos de K⁺ radicales en el mutante *cax3* con déficit de B (**Figura 45**).

Estos resultados en conjunto parecen indicar una posible relación entre el estrés por deficiencia de B, la señalización por Ca²⁺ y la homeostasis de K⁺.

IV.3.5. Concentración de Na⁺

Los resultados mostraron que la concentración de Na⁺ fue mayor en el genotipo *cb1/4/5/9* que en el silvestre, tanto en suficiencia como deficiencia de B (**Figura 46**). Se ha descrito que el complejo CBL4-CIPK24 regula la excreción de Na⁺ a través de la

membrana plasmática mediante la activación del transportador SOS1 (Quintero et al., 2002), lo cual explicaría el aumento de la concentración de este catión en el mutante *cbl1/4/5/9*.

En el mutante *cngc19* la concentración de Na^+ fue similar a la del silvestre en ambos tratamientos de B (**Figura 46**). Estos resultados son consistentes con los de Kugler et al. (2009), quienes demostraron que el ratio K^+/Na^+ no se vio alterado en este mutante.

IV.4. LA DEFICIENCIA EN BORO AFECTA AL CRECIMIENTO Y A LA MORFOLOGÍA DE LA RAÍZ PRINCIPAL DE ARABIDOPSIS

IV.4.1. Efecto sobre el crecimiento de la raíz principal

Se sabe que la estructura radical presenta una gran plasticidad y que puede ser fuertemente afectada por las condiciones ambientales (Deak y Malamy, 2005). Así, la disponibilidad de nutrientes como el nitrato, potasio, sulfato y hierro actúan como señales que las raíces pueden percibir y a las que responden (Forde y Lorenzo, 2001; López-Bucio et al., 2003).

Uno de los primeros efectos de la deficiencia de B es la inhibición del crecimiento de la raíz principal (Dugger, 1983; Marschner, 1995; Dell y Huang, 1997), que en arabidopsis estaría mediada por etileno, auxinas y ROS (Martín-Rejano et al., 2011; Camacho-Cristóbal et al., 2015).

Los resultados mostraron que en todos los genotipos analizados la deficiencia en B provocó la inhibición del crecimiento de la raíz principal a partir de las 24 h de tratamiento hasta la finalización del mismo (96 h) (**Figura 47**); sin embargo, resultó que no todos los genotipos se vieron afectados del mismo modo. Así, en los mutantes *aca10*, *cax3*, *cbl1/4/5/9*, *myb15* y *wrky46* la deficiencia en B supuso una inhibición del crecimiento de la raíz principal cercana a la del genotipo Col-0 (96 %) tras 96 h de tratamiento (**Figura 47B,C,D,H,I,A**). Por tanto, estos genes no parecen tener un papel preponderante en la inhibición del crecimiento de la raíz principal causada por el déficit de B. Sin embargo, en los genotipos *cm124*, *cngc19* y *gata4* el porcentaje de

inhibición fue menor: 85,8, 79,3 y 88,9 %, respectivamente (**Figura 47E,F,G**). Este resultado podría indicar la participación de estos genes en el proceso de inhibición del crecimiento de la raíz principal en plantas sometidas a deficiencia de B.

IV.4.2. Efectos sobre la formación de pelos radicales y la morfología apical de la raíz

La formación de pelos radicales es un proceso habitual de respuesta de las plantas ante determinadas deficiencias nutricionales, como es el caso del nitrato, fosfato, potasio y hierro, con el fin de aumentar la superficie de absorción de la raíz para la incorporación de nutrientes (Marschner, 1995). Esta respuesta también ha sido descrita en las plantas de *arabidopsis* sometidas a déficit de B, en las cuales la formación de los pelos radicales estaría regulada por la fitohormona etileno (Martín-Rejano et al., 2001; Camacho-Cristóbal et al., 2015).

En los genotipos Col-0, *bzip34*, *cbl1/4/5/9*, *gata4*, *myb15* y *wrky46* el tratamiento de deficiencia en B durante 24 h provocó la proliferación de pelos radicales en la zona de maduración de la raíz principal, sin que hubiera diferencias entre los diferentes genotipos (**Figura 49**). Esto sugiere que ninguno de los genes analizados sería esencial en la ruta de señalización que regula la formación de los pelos radicales.

También se analizó el efecto de este estrés nutricional sobre el diámetro o grosor apical de la raíz principal en los genotipos mencionados. Se observó que, en todos los genotipos, la deficiencia de B provocó un aumento significativo de este parámetro (**Figura 48**). Recientemente se ha descrito que la deficiencia en B provoca una inhibición de la elongación celular a través de una ruta de señalización relacionada con etileno, auxinas y ROS en la misma región de la raíz en la que se observó este engrosamiento apical (Camacho-Cristóbal et al., 2015). Así, la inhibición de la elongación celular junto con los procesos de división celular que seguirían ocurriendo podrían ocasionar el engrosamiento de la región apical de la raíz.

IV.5. PARTICIPACIÓN DEL CALCIO EN LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL DE DEFICIENCIA DE BORO A CORTO PLAZO EN LA RAÍZ PRINCIPAL DE ARABIDOPSIS: MODELO HIPOTÉTICO

Teniendo en cuenta en conjunto todos los resultados anteriores, se propone el siguiente modelo para explicar la participación del Ca^{2+} en la transmisión de la señal de deficiencia en B (**Figura 70**).

El déficit de B provocaría la activación de canales de Ca^{2+} , como CNGC19 y otros miembros de esta familia localizados en la membrana plasmática (2), posiblemente a través del incremento en la concentración citosólica de nucleótidos cíclicos (1), lo cual causaría la entrada de Ca^{2+} hacia el citosol. En paralelo, la señal de deficiencia en B provocaría la generación de ROS (3), que supondría la hiperpolarización de canales de Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática y facilitaría la entrada de este catión al interior celular (4). La activación de estos canales resultaría en un incremento temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ generando una firma de Ca^{2+} cuya información sería decodificada en el núcleo (5); allí, la interacción de este catión con CaM/CML y factores de transcripción (FT) daría lugar a la formación de complejos que podrían activar o reprimir la expresión génica (6). Las proteínas sensoras de Ca^{2+} como CaM, CML, CBL –que a su vez interaccionaría con CIPK– y CPK (7), tras su activación por unión a Ca^{2+} , podrían regular la actividad de proteínas diana mediante la interacción directa o por fosforilación (8), dando lugar a una respuesta fisiológica a la deficiencia de B (9). Finalmente, las CaM/CML provocarían la inhibición de los CNGC (10) y la activación de los transportadores CAX3 y ACA10, ACA12 y ACA13 (11 y 12), que restaurarían los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$.

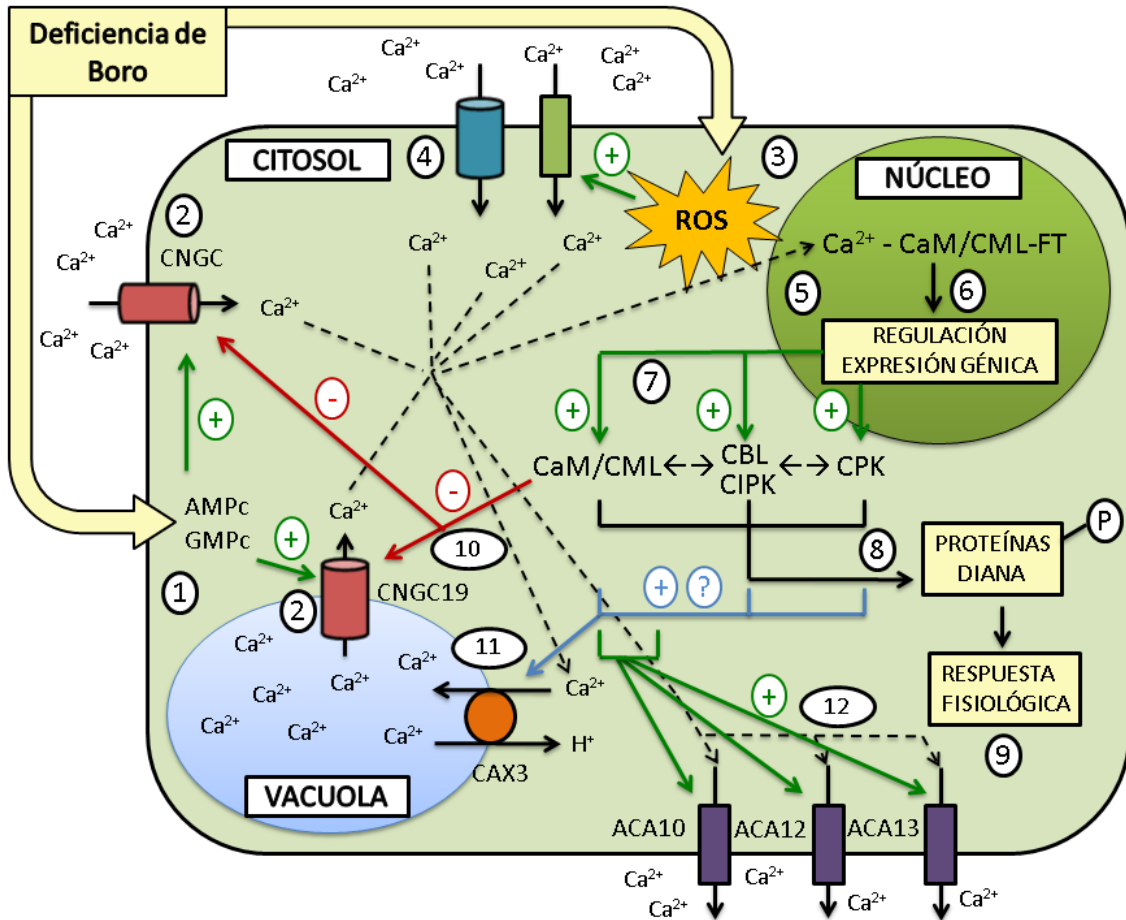


Figura 70. Mecanismo propuesto para la respuesta de las raíces de *Arabidopsis thaliana* a la deficiencia de B. La numeración indica el orden de los eventos. Para más detalles, véase el texto (modificado de González-Fontes et al., 2014).

La gran variedad de procesos fisiológicos que están regulados por Ca^{2+} y sus sensores, cuya concentración y expresiones se ven afectadas por la disponibilidad de B, podría explicar que el déficit de este micronutriente, que *a priori* solo cumple una función estructural, afecte a tantos procesos fisiológicos de las plantas.

V. CONCLUSIONES

1. En las raíces de *Arabidopsis thaliana* la deficiencia en boro a corto plazo altera la expresión de genes implicados en la homeostasis y señalización de calcio, entre otros, *CNGC19*, *CAX3*, *CIPK23* y miembros de las familias *ACA*, *CML*, *CPK* y *CBL*. Además, el déficit de boro también modifica la expresión de algunos factores de transcripción pertenecientes a las familias *MYB*, *WRKY*, *bZIP34* y *GATA*. Estos hechos podrían sugerir la participación del calcio y de factores de transcripción en la respuesta al déficit de boro.
2. La deficiencia en boro causa un aumento en la concentración de calcio citosólico en la raíz principal de *Arabidopsis*. Este resultado relacionaría la mediación del calcio en la transducción de señales asociada al déficit de boro.
3. El tratamiento con EGTA, ABA o U73122 –compuestos que afectan a la homeostasis de calcio– varía el patrón de expresión de los genes *CAX3*, *CBL1*, *CBL4*, *CBL9*, *bZIP34*, *GATA4* y *WRKY46*. Además, los experimentos de fluorescencia realizados con estos compuestos indican que el aumento de la concentración de calcio citosólico promovido por la deficiencia de boro se debe principalmente a la entrada de este catión desde el apoplasto, más que a su salida desde los reservorios intracelulares.
4. *CAX3* podría desempeñar una función primordial en la respuesta al déficit de boro mediada por calcio. Este hecho se ve apoyado por la alteración del patrón de expresión de varios genes como *CNGC19*, *CBL1*, *CBL4*, *CIPK23*, *CPK28*, *CPK29*, *CML24*, *GATA4*, *MYB15* y *WRKY46* en el mutante *cax3* en comparación con el genotipo silvestre. Además, el mutante *cax3* no experimenta un incremento en la concentración de calcio citosólico bajo deficiencia de boro.
5. La deficiencia en boro provoca un aumento en la concentración de calcio total en las raíces del mutante *aca10*. Este hecho sugiere la participación de *ACA10* en los cambios en la homeostasis del calcio asociada a la deficiencia de boro.

6. La deficiencia en boro modifica la expresión de genes implicados en el transporte de potasio (*AKT1*, *HAK5* y *SKOR*), y reduce su concentración en las raíces de los mutantes *cbl1/4/5/9* y *cax3*. Estos resultados en conjunto parecen indicar una posible relación entre el estrés por deficiencia de boro, la señalización por calcio y la homeostasis de potasio.
7. La deficiencia en boro podría afectar a la homeostasis de magnesio y de sodio al disminuir la concentración de magnesio y aumentar la de sodio en el mutante *cbl1/4/5/9*. Estos resultados indicarían una posible relación entre el estrés por la deficiencia de boro, la señalización por calcio (vía CBL) y la homeostasis de magnesio y sodio.
8. La deficiencia en boro inhibe el crecimiento de la raíz principal. Los análisis con mutantes sugieren que CML24, GATA4 y, especialmente, CNGC19 podrían estar participando en la ruta de señalización asociada a esta inhibición.
9. La deficiencia en boro provoca el engrosamiento del ápice de la raíz principal tanto en el genotipo silvestre como en los mutantes *bzip34*, *cbl1/4/5/9*, *gata4*, *myb15* y *wrky46*. Esta respuesta fenotípica sería consecuencia de la inhibición de la elongación celular causada por esta deficiencia y no parece estar relacionada con la señalización por calcio.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu I., Poza L., Bonilla I., Bolaños L. (2014).** Boron deficiency results in early repression of a cytokinin receptor gene and abnormal cell differentiation in the apical root meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 77: 117-121.
- Adams E., Shin R. (2014).** Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. 56(3): 231-249.
- Agarwal M., Hao Y., Kapoor A., Dong C.H., Fujii H., Zheng X., Zhu J.K. (2006).** A R2R3-type MYB transcription factor is involved in the cold-regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry*. 281: 37636-37645.
- Agarwala S.C., Sharma P.N., Chatterjee C., Sharma C.P. (1981).** Development and enzymatic change during pollen development in boron deficiency maize plants. *Journal of Plant Nutrition*. 3: 329-336.
- Alemán F., Nieves-Cordones M., Martínez V., Rubio F. (2011).** Root K⁽⁺⁾ acquisition in plants: the *Arabidopsis thaliana* model. *Plant Cell Physiology*. 52(9): 1603-1612.
- Alexandrova K.S., Conger B.V. (2002).** Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchard grass (*Dactylis glomerata*). *Plant Science*. 162(2): 301-307.
- Allen G.J., Chu S.P., Harrington C.L., Schumacher K., Hoffmann T. (2001).** A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature*. 411: 1053-1057.

- Amtmann A., Armengaud P. (2009).** Effects of N, P, K and S, on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 275-283.
- Andreeva Z., Barton D., Armour W. J., Li M.Y., Liao L.F., McKellar H.L., Pethybridge K.A., Marc J. (2010).** Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots. *Planta*. 232: 1263-1279.
- Andronis E.A., Moschou P.N., Toumi I., Roubelakis-Angelakis K.A. (2014).** Peroxisomal polyamine oxidase and NADPH-oxidase crosstalk for ROS homeostasis which affects respiration rate in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 5. Artículo 132.
- Armengaud P., Sulpice R., Miller A.J., Stitt M., Amtmann A., Gibon Y. (2009).** Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of potassium nutrition for glycolysis and nitrogen assimilation in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*. 150: 772-785.
- Ashley M.K., Grant M., Grabov A. (2006).** Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *Journal of Experimental Botany*. 57: 425-436.
- Batistič O., Kudla J. (2009).** Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793: 985-992.
- Batistič O., Kudla J. (2012).** Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1820: 1283-1293.

- Batistič O., Rehers M., Akerman A., Schlücking K., Steinhorst L., Yalovsky S., Kudla J. (2012).** S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses. *Cell Research*. 22(7): 1155-1168.
- Batistič O., Sorek N., Schültke S., Yalovsky S., Kudla J. (2008).** Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in Arabidopsis. *Plant Cell*. 20: 1346-1362.
- Batistič O., Waadt R., Steinhorst L., Held K., Kudla J. (2010).** CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores. *Plant Journal*. 61: 211-222.
- Baxter I., Tchieu J., Sussman M.R., Boutry M., Palmgren M.G., Gribskov M., Harper J.F., Axelsen K.B. (2003).** Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*. 132: 618-628.
- Beato V.M., Navarro-Gochicoa M.T., Rexach J., Herrera-Rodríguez M.B., Camacho-Cristóbal J.J., Kempa S., Weckwerth W., González-Fontes A. (2011).** Expression of root glutamate dehydrogenase genes in tobacco plants subjected to boron deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49(11): 1350-1354.
- Beato V.M., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., Camacho-Cristóbal J.J., Herrera-Rodríguez M.B., González-Fontes A. (2014).** Boron deficiency increases expressions of asparagine synthetase, glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase genes in tobacco roots irrespective of the nitrogen source. *Soil Science and Plant Nutrition*. 60(3): 314-324.
- Beato V.M., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., Camacho-Cristóbal J.J., Herrera-Rodríguez M.B., Maldonado J.M., González-Fontes A. (2010).** A tobacco

asparagine synthetase gene responds to carbon and nitrogen status and its root expression is affected under boron stress. *Plant Science*. 178: 289-298.

- Behera S., Wang N., Zhang C., Schmitz-Thom I., Strohkamp S., Schültke S., Hashimoto K., Xiong L., Kudla J. (2015).** Analyses of Ca^{2+} dynamics using a ubiquitin-10 promoter-driven Yellow Cameleon 3.6 indicator reveal reliable transgene expression and differences in cytoplasmic Ca^{2+} responses in Arabidopsis and rice (*Oryza sativa*) roots. *New Phytologist*. 206(2): 751-760.
- Bellaloui N., Yadav R.C., Chern M.S., Hu H., Gillen A.M., Greve C., Dandekar A.M., Ronald P.C., Brown P.H. (2003).** Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem-boron mobility in rice. *Physiologia Plantarum*. 117: 79-84.
- Benjamins R., Galván-Ampudia C.S., Hooykaas P.J.J., Offringa R. (2003).** PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiology*. 132: 1623-1630.
- Bennett A., Rowe R.I., Soch N., Eckhert C.D. (1999).** Boron stimulates yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) growth. *Journal of Nutrition*. 129(12): 2236-2238.
- Blaser-Grill J., Knoppik D., Amberger A., Goldbach H. (1989).** Influence of boron on the membrane potential in *Elodea densa* and *Helianthus annuus* roots and H^+ extrusion of suspension cultured *Daucus carota* cells. *Plant Physiology*. 90: 280-284.
- Blevins D.G., Lukaszewski K.M. (1998).** Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Biology*. 49: 481-500.

- Bolaños L., Esteban E., De Lorenzo C., Fernandez-Pascual M., De Felipe M.R., Garate A., Bonilla I. (1994).** Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) rhizobium nodules. *Plant Physiology*. 104(1): 85-90.
- Bolaños L., Lukaszewski K., Bonilla I., Blevins D. (2004).** Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 907-912.
- Bolaños L., Martín M., El-Hamdaoui A., Rivilla R., Bonilla I. (2006).** Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca^{2+} . *Plant and Soil*. 280: 135-142.
- Bouchereau A., Aziz A., Larher J., Martin-Tanguy J. (1999).** Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*. 140: 103-125.
- Brown P.H., Bellaloui N., Wimmer M.A., Bassil E.S., Ruiz J., Hu H., Pfeiffer H., Dannel F., Römheld V. (2002).** Boron in plant biology. *Plant Biology*. 4: 205-223.
- Brown P.H., Hu H. (1996).** Phloem mobility of boron is species dependent. Evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Annals of Botany*. 77: 497-505.
- Brown P.H., Shelp B.J. (1997).** Boron mobility in plants. *Plant Soil*. 193: 85-101.
- Cakmak I., Römheld V. (1997).** Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil*. 193: 71-83.
- Camacho-Cristóbal J.J., Anzelotti D., González-Fontes A. (2002).** Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 997-1002.

- Camacho-Cristóbal J.J., González-Fontes A. (2007).** Boron deficiency decreases plasmalemma H^+ -ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots. *Planta*. 226: 443-451.
- Camacho-Cristóbal J.J., Herrera-Rodríguez M.B., Beato V.M., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., Maldonado J.M., González-Fontes A. (2008).** The expression of several cell wall-related genes in Arabidopsis roots is down-regulated under boron deficiency. *Environmental and Experimental Botany*. 63: 351-358.
- Camacho-Cristóbal J.J., Lunar L., Lafont F., Baumert A., González-Fontes A. (2004).** Boron deficiency causes accumulation of chlorogenic acid and caffeoyl polyamine conjugates in tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology*. 161: 879-881.
- Camacho-Cristóbal J.J., Maldonado J.M., González-Fontes A. (2005).** Boron deficiency increases putrescine levels in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*. 162: 921-928.
- Camacho-Cristóbal J.J., Martín-Rejano E.M., Herrera-Rodríguez M.B., Navarro-Gochicoa M.T., Rexach J., González-Fontes A. (2015).** Boron deficiency inhibits root cell elongation via an ethylene/auxin/ROS-dependent pathway in Arabidopsis seedlings. *Journal of Experimental Botany*. 66(13): 3831-3840.
- Camacho-Cristóbal J.J., Rexach J., González-Fontes A. (2008b).** Boron in plants: deficiency and toxicity. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50(10): 1247-1255.
- Camacho-Cristóbal J.J., Rexach J., Herrera-Rodríguez M.B., Navarro-Gochicoa M.T., González-Fontes A. (2011).** Boron deficiency and transcript level changes. *Plant Science*. 181(2): 85-89.

- Chan H., Babayan V., Blyumin E., Gandhi C., Hak K., Harake D., Kumar K., Lee P., Li T.T., Liu H.Y., Lo T.C., Meyer C.J., Stanford S., Zamora K.S., Saier M.H. (2010).** The p-type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 19: 5-104.
- Chatterjee M., Tabi Z., Galli M., Malcomber S., Buck A., Muszynski M., Gallavotti A. (2014).** The boron efflux transporter ROTTEN EAR is required for maize inflorescence development and fertility. *Plant Cell*. 26(7): 2962-2977.
- Chen H., Lai Z., Shi J., Xiao Y., Chen Z., Xu X. (2010).** Roles of Arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biology*. 10: 281.
- Chen X., Chang M., Wang B., Wu B. (1997).** Cloning of a Ca^{2+} ATPase gene and the role of cytosolic Ca^{2+} in the gibberellin-dependent signaling pathway in aleurone cells. *Plant Journal*. 11: 363-371.
- Cheng N.H., Pittman J.K., Shigaki T., Lachmansingh J., LeClere S., Lahner B., Salt D.E., Hirschi K.D. (2005).** Functional association of Arabidopsis CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiology*. 138: 2048-2060.
- Chin K., Moeder W., Yoshioka K. (2009).** Biological roles of cyclic nucleotide-gated ion channels in plants: what we know and don't know about this 20 member ion channel family. *Botany*. 87: 668-677.
- Choi H.I., Park H.J., Park J.H., Kim S., Im M.Y., Seo H.H., Kim Y.W., Hwang I., Kim S.Y. (2005).** Arabidopsis calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology*. 139: 1750-1761.

- Choi W.G., Toyota M., Kim S.H., Hilleary R., Gilroy S. (2014).** Salt stress-induced Ca^{2+} waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A.* 111(17): 6497-6502.
- Chung W.S., Lee S.H., Kim J.C., Heo W.D., Kim M.C., Park C.Y., Park H.C., Lim C.O., Kim W.B., Harper J.F., Cho M.J. (2000).** Identification of a calmodulin regulated soybean Ca^{2+} ATPase (SCA1) that is located in the plasma membrane. *Plant Cell.* 12: 1393-1407.
- Clarkson D.T., Hanson J.B. (1980).** The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology.* 31: 239-298.
- Clough S.J., Fengler K.A., Yu I.C., Lippok B., Smith R.K.Jr., Bent A.F. (2000).** The Arabidopsis dnd1 'defense, no death' gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 97: 9323-9328.
- Conn S.J., Gilliham M., Athman A., Schreiber A.W., Baumann U., Moller I., Cheng N.H., Stancombe M.A., Hirschi K.D., Webb A.A.R. (2011).** Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in Arabidopsis. *Plant Cell.* 23: 240-257.
- Cui H. (2012).** Killing two birds with one stone: transcriptional regulators coordinate development and stress responses in plants. *Plant Signaling and Behavior.* 7(6): 701-703.
- D'Angelo C., Weinl S., Batistič O., Pandey G.K., Cheong Y.H., Schültke S., Albrecht V., Ehlert B., Schulz B., Harter K., Luan S., Bock R., Kudla J. (2006).** Alternative complex formation of the Ca^{2+} -regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic

acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 48: 857-872.

D'Orazi D., Bagni N. (1987). In vitro interactions between polyamides and pectic substances. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 148: 1259-1263.

Dammann C., Ichida A., Hong B., Romanowsky S.M., Hrabak E.M., Harmon A.C., Pickard B.G., Harper J.F. (2003). Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 132: 1840-1848.

Dannel F., Pfeffer H., Römheld V. (2000). Characterization of root boron pool, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotopes ^{10}B and ^{11}B . *Australian Journal of Plant Physiology*. 27: 397-405.

De Cnodder T., Vissenberg K., Van Der Straeten D., Verbelen J.P. (2005). Regulation of cell length in the *Arabidopsis thaliana* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: a matter of apoplastic reactions. *New Phytologist*. 168: 541-550.

Deak K.I., Malamy J. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. *Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. 43: 17-28.

Delk N.A., Johnson K.A., Chowdhury N.I., Braam J. (2005). CML24, regulated in expression by diverse stimuli, encodes a potential Ca^{2+} sensor that functions in responses to abscisic acid, daylength, and ion stress. *Plant Physiology*. 139: 240-253.

- Dell B., Huang L. (1997).** Physiological response of plants to low boron. *Plant Soil*. 193: 103-120.
- Dell B., Malajczuk N. (1994).** Boron deficiency in eucalypt plantations in China. *Canadian Journal of Forest Research*. 24(12): 2409-2416.
- Demidchik V., Maathuis F.J. (2007).** Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signaling and development. *New Phytologist*. 175: 387-404.
- Dennison K.L., Spalding E.P. (2000).** Glutamate-gated calcium fluxes in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 124(4): 1511-1514.
- Devirian T.A., Volpe S.L. (2003).** The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(2): 219-231.
- Dietrich P., Anschütz U., Kugler A., Becker D. (2010).** Physiology and biophysics of plant ligand-gated ion channels. *Plant Biology*. 12: 80-93.
- Ding Z.J., Yan J.Y., Xu X.Y., Yu D.Q., Li G.X., Zhang S.Q., Zheng S.J. (2014).** Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in Arabidopsis. *Plant Journal*. 79: 13-27.
- Ding Z., Li S., An X., Liu X., Qin H., Wang D. (2009).** Transgenic expression of *MYB15* confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Genetics and Genomics*. 36: 17-29.
- Dodd A.N., Kudla J., Sanders D. (2010).** The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 593-620.

- Dong A., Xin H., Yu Y., Sun C., Cao K., Shen W.H. (2002).** The subcellular localization of an unusual rice calmodulin isoform, OsCaM61, depends on its prenylation status. *Plant Molecular Biology*. 48: 203-210.
- Drerup M.M., Schlücking K., Hashimoto K., Manishankar P., Steinhorst L., Kuchitsu K., Kudla J. (2013).** The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the Arabidopsis NADPH oxidase RBOHF. *Molecular Plant*. 6: 559-569.
- Dugger W.M. (1983).** Boron in plants metabolism. En: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, vol 15B (Lauchli A., Bielecki R.L., eds). Springer-Verlag, Berlin. 626-650.
- Eichert T., Goldbach H.E. (2010).** Transpiration rate affects the mobility of foliar applied boron in *Ricinus communis* L. cv. Impala. *Plant Soil*. 328: 165-174.
- El-Shintinawy F. (1999).** Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflowers leaves. *Photosynthetica*. 36: 565-573.
- Epstein E., Rains D.W., Elzam O.E. (1963).** Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 49: 684-692.
- Estruch J.J., Kadwell S., Merlin E., Crossland L. (1994).** Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 91: 8837-8841.
- Felle H.H., Zimmermann M.R. (2007).** Systemic signaling in barley through action potentials. *Planta*. 226: 203-214.

- Ferrol N., Donaire J.P. (1992).** Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells. *Plant Science*. 86: 41-47.
- Finka A., Cuendet A.F.H., Maathuis F.J.M., Saidi Y., Goloubinoff P. (2012).** Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *Plant Cell*. 24: 3333-3348.
- Fitzpatrick K.L., Reid R.J. (2009).** The involvement of aquaglyceroporins in transport of boron in barley roots. *Plant, Cell and Environment*. 32: 1357-1365.
- Forde B., Lorenzo H. (2001).** The nutritional control of root development. *Plant and Soil*. 232: 51-68.
- Fowler S., Thomashow M.F. (2002).** Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*. 14(8): 1675-1690.
- Gajdanowicz P., Michard E., Sandmann M., Rocha M., Correa L.G.G. (2011).** Potassium (K⁺) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 108: 864-869.
- Galon Y., Finkler A., Fromm H. (2010).** Calcium-regulated transcription in plants. *Molecular Plant*. 3: 653-669.
- Galon Y., Nave R., Boyce J.M., Nachmias D., Knight M.R., Fromm H. (2008).** Calmodulin binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in Arabidopsis. *FEBS Letters*. 582: 943-948.

- Gambale F., Uozumi N. (2006).** Properties of Shaker-type potassium channels in higher plants. *Journal of Membrane Biology*. 210: 1-19.
- Gargantini P.R., Gonzalez-Rizzo S., Chinchilla D., Raices M., Giammaria V., Ulloa R.M., Frugier F., Crespi M.D. (2006).** A CDPK isoform participates in the regulation of nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Journal*. 48: 843-856.
- Gaymard F., Pilot G., Lacombe B., Bouchez D., Bruneau D. (1998).** Identification and disruption of a plant Shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*. 94: 647-655.
- Geiger D., Scherzer S., Mumm P., Marten I., Ache P., Matschi S., Liese A., Wellmann C., Al-Rasheid K.A., Grill E., Romeis T., Hedrich R. (2010).** Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*. 107: 8023-8028.
- Gerke V., Moss S.E. (2002).** Annexins: from structure to function. *Physiological Reviews*. 82: 331-371.
- Gierth M., Maser P. (2007).** Potassium transporters in plants-involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters*. 581: 2348-2356.
- Gierth M., Maser P., Schroeder J.I. (2005).** The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in Arabidopsis roots. *Plant Physiology*. 137: 1105-1114.
- Goldbach H.E. (1997).** A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: suggestions for further research and methodological requirements. *Journal of Trace Elements Technology*. 15: 51-91.

- Goldbach H.E., Wimmer M. (2007).** Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 170: 39-48.
- Goldbach H.E., Yu Q., Wingender R., Schulz M., Wimmer M., Findelee P., Baluska F. (2001).** Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 164: 173-181.
- Goldberg S. (1997).** Reaction of boron with soils. *Plant Soil*. 193: 35-48.
- González-Fontes A., Navarro-Gochicoa M.T., Camacho-Cristóbal J.J., Herrera-Rodríguez M.B., Quiles-Pando C., Rexach J. (2014).** Is Ca^{2+} involved in the signal transduction pathway of boron deficiency? New hypotheses for sensing boron deprivation. *Plant Science*. 217-218: 135-139.
- González-Fontes A., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., Herrera-Rodríguez M.B., Beato V.M., Maldonado J.M., Camacho-Cristóbal J.J. (2008).** Is boron involved solely in structural roles in vascular plants? *Plant Signaling and Behavior*. 3: 24-26.
- González-Fontes A., Rexach J., Quiles-Pando C., Herrera-Rodríguez M.B., Camacho-Cristóbal J.J., Navarro-Gochicoa M.T. (2013).** Transcription factors as potential participants in the signal transduction pathway of boron deficiency. *Plant Signaling and Behavior*. 8(11): 26114-26117.
- Grant R.C., Lauchli A., Polito V.S. (1985).** Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. *Plant Physiology*. 79: 207-211.

- Han S., Chen L.S., Jiang H.X., Smith B.R., Yang L.T., Xie C.Y. (2008).** Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 165: 1331-1341.
- Harper J.F. (2001).** Dissecting calcium oscillators in plant cells. *Trends in Plant Science*. 6(9).
- Harper J.F., Hong B., Hwang I., Guo H.Q., Stoddard R., Huang J.F., Palmgren M.G., Sze H. (1998).** A novel calmodulin-regulated Ca^{2+} -ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 1099-1106.
- Hashimoto K., Eckert C., Anschutz U., Scholz M., Held K., Waadt R., Reyer A., Hippler M., Becker D., Kudla J. (2011).** Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins. *Biological Chemistry*. 287(11): 7956-7968.
- Hashimoto K., Kudla J. (2011).** Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie*. 93: 2054-2059.
- Held K., Pascaud F., Eckert C., Gajdanowicz P., Hashimoto K., Corratge-Faillie C., Offenborn J.N., Lacombe B., Dreyer I., Thibaud J.B., Kudla J. (2011).** Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Research*. 21: 1116-1130.
- Herrera-Rodríguez M.B., González-Fontes A., Rexach J., Camacho-Cristóbal J.J., Maldonado J.M., Navarro-Gochicoa M.T. (2010).** Role of boron in vascular plants and response mechanisms to boron stress. *Plant Stress*. 4: 115-122.

Hetherington A.M., Brownlee C. (2004). The generation of Ca^{2+} signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 401-427.

Hirsch R.E., Lewis B.D., Spalding E.P., Sussman M.R. (1998). A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*. 280: 918-921.

Hodge A. (2004). The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*. 162: 9-24.

Hong J.H., Seah S.W., Xu J. (2013). The root of ABA action in environmental stress response. *Plant Cell Reports*. 32: 971-983.

Hopmans P., Flinn D.W. (1984). Boron deficiency in *Pinus radiata* D. Don and the effect of applied boron on height growth and nutrient uptake. *Plant and Soil*. 79: 295-298.

Hu H., Brown P.H. (1994). Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. Evidence for a structural role of boron in the cell wall. *Plant Physiology*. 105: 681-689.

Hu H., Brown P.H. (1997). Absorption of boron by plants roots. *Plant Soil*. 193: 49-58.

Huang L., Bell R.W., Dell B. (2001). Boron supply into wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Wilgoyne) ears whilst still enclosed within leaf sheaths. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1731-1738.

Huang L., Bell R.W., Dell B. (2008). Evidence of phloem boron transport in response to interrupted boron supply in white lupin (*Lupinus albus* L. cv. Kiev mutant) at the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany*. 59: 575-583.

- Huh S.M., Noh E.Y., Kim H.G., Jeon B.W., Bae K., Hu H.C., Kwak J.M., Park O.K. (2010).** Arabidopsis annexins AnnAt1 and AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt-stress responses. *Plant Cell Physiology*. 59: 1499-1514.
- Hwang I., Sze H., Harper J.F. (2000).** A calcium-dependent protein kinase can inhibit a calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump (ACA2) located in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 97: 6224-6229.
- Ivashuta S., Liu J., Lohar D.P., Haridas S., Bucciarelli B., Van den Bosch K.A., Vance C.P., Harrison M.J., Gantt J.S. (2005).** RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development. *Plant Cell*. 17: 2911-2921.
- Iwano W.M., Igarashi M., Tarutani Y., Kaothien-Nakayama P., Nakayama H., Moriyama H., Yakabe R., Entani T., Shimosato-Asano H., Ueki M., Tamiya G., Takayama S. (2014).** A pollen coat-inducible autoinhibited Ca^{2+} -ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae. *Plant Cell*. 26: 636-649.
- Jiang Y., Deyholos M.K. (2006).** Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biology*. 6: 25.
- Jiao Y., Sun L., Song Y., Wang L., Liu L., Zhang L., Liu B., Li N., Miao C., Hao F. (2013).** AtrbohD and AtrbohF positively regulate abscisic acid inhibited primary root growth by affecting Ca^{2+} signaling and auxin response of roots in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*. 64(14): 4183-4192.

- Kabala K., Klobus G. (2005).** Plant Ca^{2+} -ATPases. *Acta Physiologiae Plantarum*. 27: 559-574.
- Kanchiswamy C.N., Malnoy M., Occhipinti A., Maffei M.E. (2014).** Calcium imaging perspectives in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 15: 3842-3859.
- Kaplan B., Sherman T., Fromm H. (2007).** Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters*. 581: 2237-2246.
- Kasajima I., Ide Y., Hirai M.Y., Fujiwara T. (2010).** WRKY6 is involved in the response to boron deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 139(1): 80-92.
- Kastori R., Plesnicar M., Pankovic D., Sakac Z. (1995).** Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and soluble carbohydrates in sunflowers leaves as affected by boron deficiency. *Journal of Plant Nutrition*. 18: 1751-1763.
- Kaufmann K., Pajoro A., Angenent G.C. (2010).** Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nature Reviews Genetics*. 11: 830-842.
- Keinath N.F., Waadt R., Brugman R., Schroeder J.I., Grossmann G., Schumacher K., Krebs M. (2015).** Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on flg22- and chitin-induced transient $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ patterns in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*. 8(8): 1188-1200.
- Kim M.C., Chung W.S., Yun D.J., Cho M.J. (2009).** Calcium and calmodulin- mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant*. 2(1): 13-21.

- Kim M.J., Ciani S., Schachtman D.P. (2010).** A peroxidase contributes to ROS production during Arabidopsis root response to potassium deficiency. *Molecular Plant*. 3: 420-427.
- Kobayashi M., Mutoh T., Matoh T. (2004).** Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. IV. Genes induced under low boron supply. *Journal of Experimental Botany*. 55(401): 1441-1443.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. (2007).** Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell*. 19: 1065-1080.
- Koshiba T., Kobayashi M., Ishihara A., Matoh T. (2010).** Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. VI. Calcium is involved in early responses to boron deprivation. *Plant Cell Physiology*. 51(2): 323-327.
- Krebs M., Held K., Binder A., Hashimoto K., Den Herder G., Parniske M., Kudla J., Schumacher K. (2012).** FRET-based genetically encoded sensors allow high resolution live cell imaging of Ca²⁺ dynamics. *Plant Journal*. 69: 181-192.
- Kudla J., Batistič O., Hashimoto K. (2010).** Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell*. 22: 541-563.
- Kudla J., Xu Q., Harter K., Gruissem W., Luan S. (1999).** Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 96(8): 4718-4723.
- Kugler A., Kohler B., Palme K., Wolff P., Dietrich P. (2009).** Salt dependent regulation of a CNG channel subfamily in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*. 27(9): 1-11.

- Kumar K., Mosa K.A., Chhikara S., Musante C., White J.C., Dhankher O.P. (2014).** Two rice plasma membrane intrinsic proteins, OsPIP2;4 and OsPIP2;7, are involved in transport and providing tolerance to boron toxicity. *Planta*. 239(1): 187-198.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D.G., Schroeder J.I. (2003).** NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO Journal*. 22(11): 2623-2633.
- Kwak J.M., Nguyen V., Schroeder J.I. (2006).** The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiology*. 141: 323-329.
- Lacombe B., Pilot G., Michard E., Gaymard F., Sentenac H. (2000).** A shaker-like K⁺ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of Arabidopsis. *Plant Cell*. 12: 837-851.
- Lagacé M., Matton D.P. (2004).** Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta*. 219(1): 185-189.
- Lagarde D., Basset M., Lepetit M., Conejero G., Gaymard F. (1996).** Tissue-specific expression of Arabidopsis *AKT1* gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant Journal*. 9: 195-203.
- Lamport D.T.A., Várnai P. (2013).** Periplasmic arabinogalactan glycoproteins act as a calcium capacitor that regulates plant growth and development. *New Phytologist*. 197: 58-64.

- Lebaudy A., Véry A.A., Sentenac H. (2007).** K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Letters*. 581: 2357-2366.
- Leigh R.A., Jones R.G.W. (1984).** A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. *New Phytologist*. 97: 1-13.
- Lemarchand D., Gaillardet J., Lewin E., Allégre C.J. (2000).** The influence of rivers on marine boron isotopes and implications for reconstructing past ocean pH. *Nature*. 408: 951-954.
- Li J., Brader G., Kariola T., Palva E.T. (2006).** WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant Journal*. 46: 477-491.
- Li L., Kim B.G., Cheong Y.H., Pandey G.K., Luan S. (2006).** A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 103: 12625-12630.
- Li Y., Lee K.K., Walsh S., Smith C., Hadingham S., Sorefan K., Cawley G., Bevan M.W. (2006).** Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in Arabidopsis by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Research*. 16: 414-427.
- Limonta M., Romanowsky S., Olivari C., Bonza M.C., Luoni L., Rosenberg A., Harper J.F., De Michelis M.I. (2014).** ACA12 is a deregulated isoform of plasma membrane Ca²⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 84: 387-397.
- Liu K., Li L., Luan S. (2006).** Intracellular K⁺ sensing of SKOR, a Shaker-type K⁺ channel from Arabidopsis. *Plant Journal*. 46: 260-268.

- Liu K., Liu L.L., Ren Y.L., Wang Z.Q., Zhou K.N., Liu X., Wang D., Zheng M., Cheng Z.J., Lin Q.B., Wang J.L., Wu F.Q., Zhang X., Guo X.P., Wang C.M., Zhai H.Q., Jiang L., Wan J.M. (2015).** Dwarf and tiller-enhancing 1 regulates growth and development by influencing boron uptake in boron limited conditions in rice. *Plant Science*. 236: 18-28.
- Liu P.P., Koizuka N., Martin R.C., Nonogaki H. (2005).** The BME3 (blue micropylar end 3) GATA zinc finger transcription factor is a positive regulator of Arabidopsis seed germination. *Plant Journal*. 44: 960-971.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Herrera-Estrella L. (2003).** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 280-287.
- Lu S.X., Hrabak E.M. (2002).** An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*. 128: 1008-1021.
- Lucca N., León G. (2012).** Arabidopsis ACA7, encoding a putative auto-regulated Ca^{2+} -ATPase, is required for normal pollen development. *Plant Cell*. 31: 651-659.
- Ma W., Berkowitz G.A. (2011).** Ca^{2+} conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytologist*. 190: 566-572.
- Ma W., Smigel A., Tsai Y.C., Braam J., Berkowitz G.A. (2009).** Innate immunity signaling: cytosolic Ca^{2+} elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein. *Plant Physiology*. 148: 818-828.

- Maathuis F.J.M. (2009).** Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*. 12: 250-258.
- Maathuis F.J.M., Sanders D. (1993).** Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 191: 302-307.
- Maathuis F.J.M., Sanders D. (1994).** Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 91: 9272-9276.
- Manfield I.W., Devlin P.F., Jen C.H., Westhead D.R., Gilmartin P.M. (2007).** Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the *Arabidopsis* GATA gene family. *Plant Physiology*. 143: 941-958.
- Marschner H. (1995).** Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 379-396.
- Marschner H. (2012).** Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier, London.
- Marten I., Hoth S., Deeken R., Ache P., Ketchum K.A. (1999).** AKT3, a phloem-localized K^+ channel, is blocked by protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 96: 7581-7586.
- Martinez-Ballesta M.C., Bastías E., Zhu C., Schäffner A.R., González-Moro B., González-Murua C., Carvajal M. (2008).** Boric acid and salinity effects on maize roots. Response of aquaporins ZmPIP1 and ZmPIP2, and plasma membrane H^+ -ATPase, in relation to water and nutrient uptake. *Physiologia Plantarum*. 132(4): 479-490.

- Martín-Rejano E.M., Camacho-Cristóbal J.J., Herrera-Rodríguez M.B., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., González-Fontes A. (2011).** Auxin and ethylene are involved in the responses of root system architecture to low boron supply in *Arabidopsis* seedlings. *Physiologia Plantarum*. 142(2): 170-178.
- Matoh T., Ochiai K. (2005).** Distribution and partitioning of newly taken-up boron in sunflower. *Plant Soil*. 278: 351-360.
- Matschi S., Werner S., Schulze W.X., Legen J., Hilger H.H., Romeis T. (2013).** Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. *Plant Journal*. 73: 883-896.
- Maurel C., Verdoucq L., Luu D.T., Santoni V. (2008).** Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 595-624.
- McCormack E., Braam J. (2003).** Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 159: 585-598.
- McCormack E., Tsai Y.C., Braam J. (2005).** Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends in Plant Science*. 10: 383-389.
- Mehlmer N., Wurzinger B., Stael S., Hofmann-Rodrigues D., Csaszar E., Pfister B., Bayer R., Teige M. (2010).** The Ca^{2+} -dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 63: 484-498.
- Miwa K., Fujiwara T. (2010).** Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Annals of Botany*. 105: 1103-1108.

- Miwa K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K., Fujiwara T. (2007).** Plants tolerant of high boron levels. *Science*. 318(5855): 1417.
- Miwa K., Wakuta S., Takada S., Ide K., Takano J., Naito S., Omori H., Matsunaga T., Fujiwara T. (2013).** Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 163(4): 1699-1709.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A., Ikura M., Tsien R.Y. (1997).** Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 388: 882-887.
- Mousavi S.A.R., Chauvin A., Pascaud F., Kellenberger S.M., Farmer E.E. (2013).** Glutamate receptor-like genes mediate leaf-to-leaf wound signaling. *Nature*. 500(7463): 422-426.
- Mozafar A. (1993).** Role of Boron in Seed Production. En: Gupta U.C., ed. *Boron and its Role in Crop Production*. Boca Raton, FL: CRC Press. 187-208.
- Myers C., Romanowsky S.M., Barron Y.D., Garg S., Azuse C.L., Curran A., Davis R.M., Hatton J., Harmon A.C., Harper J.F. (2009).** Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes. *Plant Journal*. 59: 528-539.
- Nagaoka S., Takano T. (2003).** Salt tolerance-related protein STO binds to a MYB transcription factor homologue and confers salt tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*. 54: 2231-2237.
- Nath M., Tuteja N. (2015).** NPKS uptake, sensing, and signaling and miRNAs in plant nutrient stress. *Protoplasma*. 1-20.

- Newman L.J., Perazza D.E., Juda L., Campbell M.M. (2004).** Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the *det3* mutant phenotype. *Plant Journal*. 37: 239-250.
- Nielsen F.H. (2002).** Boron in human and animal nutrition. *Plant Soil*. 193: 199-208.
- Nieves-Cordones M., Alemán F., Martínez V., Rubio F.J. (2014).** K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *Plant Physiology*. 171(9): 688-695.
- O'Neill M.A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A.G. (2004).** Rhamnogalacturonan II: structure and function of borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 109-139.
- Obermeyer G., Kriechbaumer R., Strasser D., Maschessnig A., Bentrup F.W. (1996).** Boric acid stimulates the plasma H⁺-ATPase of ungerminated lily pollen grains. *Physiologia Plantarum*. 98: 281-290.
- Oiwa Y., Kitayama K., Kobayashi M., Matoh T. (2013).** Boron deprivation immediately causes cell death in growing roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Soil Science & Plant Nutrition*. 59: 621-627.
- Pallotta M., Schnurbusch T., Hayes J., Hay A., Baumann U., Paull J., Langridge P., Sutton T. (2014).** Molecular basis of adaptation to high soil boron in wheat landraces and elite cultivars. *Nature*. 514(7520): 88-91.
- Payne C.T., Clement J., Arnold D., Lloyd A. (1999).** Heterologous MYB genes distinct from GL1 enhance trichome production when overexpressed in *Nicotiana tabacum*. *Development*. 126: 671-682.

- Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B. (2000).** Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*. 406: 731-734.
- Peng L., Zeng C., Shi L., Cai H., Xu F. (2012).** Transcriptional profiling reveals adaptive responses to boron deficiency stress in Arabidopsis. *Zeitschrift für Naturforschung*. 67(9-10): 510-524.
- Pérez-Castro R., Kasai K., Gainza-Cortés F., Ruiz-Lara S., Casaretto J.A., Peña-Cortés H., Tapia J., Fujiwara T., González E. (2012).** VvBOR1, the grapevine ortholog of AtBOR1, encodes an efflux boron transporter that is differentially expressed throughout reproductive development of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Physiology*. 53(2): 485-494.
- Perochon A., Aldon D., Galaud J.P., Ranty B. (2011).** Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. *Biochimie*. 93: 2048-2053.
- Pittman J.K., Bonza M.C., De Michelis M.I. (2011).** Ca²⁺ pumps and Ca²⁺ antiporters in plant development, en: Geisler M., Venema K. (Eds.). Transporters and pumps in plant signaling. 133-161.
- Pnueli L., Hallak-Herr E., Rozenberg M., Cohen M., Goloubinoff P., Kaplan A., Mittler R (2002).** Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant Journal*. 31(3): 319-330.
- Popescu S.C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Seay M., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S.P. (2007).** Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density Arabidopsis protein microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 104: 4730-4735.

- Power P.P., Woods W.G. (1997).** The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant Soil*. 193: 1-13.
- Ptashne M. (1988).** How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*. 335: 683-689.
- Putnam-Evans C., Harmon A., Palevitz B.A., Fechheimer M., Cormier M.J. (1989).** Calcium dependent protein kinase is localized with F-actin in plant cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 12: 12-22.
- Pyo Y.J., Gierth M., Schroeder J.I., Cho M.H. (2010).** High-affinity K⁺ transport in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. *Plant Physiology*. 153: 863-875.
- Qudeimata E., Faltusz A.M.C., Wheeler G., Lang D., Brownlee C., Reski R., Frank W. (2008).** A P1B-type Ca²⁺ATPase is essential for stress adaptation in *Physcomitrella patens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 105: 19555-19560.
- Quiles-Pando C., Rexach J., Navarro-Gochicoa M.T., Camacho-Cristóbal J.J., Herrera-Rodríguez M.B., González-Fontes A. (2013).** Boron deficiency increases the levels of cytosolic Ca²⁺ and expression of Ca²⁺-related genes in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 65: 55-60.
- Quintero F.J., Ohta M., Shi H., Zhu J.K., Pardo J.M. (2002).** Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 99: 9061-9066.

- Rawson H.M. (1996).** The developmental stage during which boron limitation causes sterility in wheat genotypes and the recovery of fertility. *Australian Journal of Plant Physiology*. 23: 709-717.
- Reddy A.S., Ali G.S., Celesnik H., Day I.S. (2011).** Coping with stresses: roles of calcium and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell*. 23: 2010-2032.
- Redondo-Nieto M., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Bonilla I., Bolaños L. (2012).** Boron and calcium induce major changes in gene expression during legume nodule organogenesis. Does boron have a role in signaling? *New Phytologist*. 195: 14-19.
- Redondo-Nieto M., Reguera M., Bonilla I., Bolaños L. (2008).** Boron dependent membrane glycoproteins in symbiosome development and nodule organogenesis: a model for a common role of boron in organogenesis. *Plant Signaling and Behavior*. 3(5): 298-300.
- Redondo-Nieto M., Wilmot A., El-Hamdaoui A., Bonilla I., Bolaños L. (2003).** Relationship between boron and calcium in the N₂-fixing legume-rhizobia symbiosis. *Plant Cell Environment*. 26: 1905-1915.
- Reguera M., Espí A., Bolaños L., Bonilla I., Redondo-Nieto M. (2009).** Endoreduplication before cell differentiation fails in boron-deficient legume nodules. Is boron involved in signaling during cell cycle regulation? *New Phytologist*. 183(1): 8-12.
- Reid R. (2007).** Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant Cell Physiology*. 48: 1673-1678.

- Reid R. (2014).** Understanding the boron transport network in plants. *Plant Soil*. 385: 1-13.
- Rerkasem B., Lordkaew S., Dell B. (1997).** Boron requirement for reproductive development in wheat. *Soil Science and Plant Nutrition*. 43: 953-957.
- Richards S.L., Laohavisit A., Mortimer J.C., Shabala L., Swarbreck S.M., Shabala S., Davies J.M. (2014).** Annexin1 regulates de H_2O_2 -induced calcium signature in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Journal*. 77(1): 136-145.
- Riveras E., Alvarez J.M., Vidal E.A., Oses C., Vega A., Gutiérrez R.A. (2015).** The calcium ion is a second messenger in the nitrate signaling pathway of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 169: 1397-1404.
- Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S., Zik M., Fromm H., Gruissem W. (1999).** The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO Journal*. 18: 1996-2007.
- Rudd J.J., Franklin-Tong V.E. (1999).** Calcium signaling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55: 214-232.
- Ruuhola T., Keinänen M., Keski-Saari S., Lehto T. (2011).** Boron nutrition affects the carbon metabolism of silver birch seedlings. *Tree Physiology*. 31: 1251-1261.
- Sanders D., Brownlee C., Harperc J.F. (1999).** Communicating with calcium. *Plant Cell*. 11: 691-706.
- Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., Harper J.F. (2002).** Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*. 14: 401-417.

- Schachtman D.P., Shin R. (2007).** Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 47-69.
- Schielt M., Palmgreen M. (2005).** Two plant Ca^{2+} pumps expressed in stomatal guard cells show opposite expression patterns during cold stress. *Physiologia Plantarum*. 124: 278-283.
- Schroeder J.I., Ward J.M., Gassmann W. (1994).** Perspectives on the physiology and structure of inward rectifying K^+ channels in higher plants: biophysical implications for K^+ uptake. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 23: 441-471.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. (2002).** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*. 31(3): 279-292.
- Shelp B.J., Kitheka A.M., Vanderpool R.A., Van Cauwenberghe O.R., Spiers G.A. (1998).** Xylem-to-phloem transfer of boron in broccoli and lupin during early reproductive growth. *Physiologia Plantarum*. 104: 533-540.
- Shelp B.J., Marentes E., Kithka A.M., Vivekanandan P. (1995).** Boron mobility in plants. *Physiologia Plantarum*. 94: 356-361.
- Shi J., Kim K.N., Ritz O., Albrecht V., Gupta R., Harter K., Luan S., Kudla J. (1999).** Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in Arabidopsis. *Plant Cell*. 11: 2393-2405.

- Shikata M., Matsuda Y., Ando K., Nishii A., Takemura M., Yokota A., Kohchi T. (2004).** Characterization of Arabidopsis ZIM, a member of a novel plant specific GATA factor gene family. *Journal of Experimental Botany*. 55: 631-639.
- Shin R. (2014).** Strategies for improving potassium use efficiency in plants. *Molecules and Cells*. 37(8): 575-584.
- Shin R., Berg R.H., Schachtman D.P. (2005).** Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiology*. 46: 1350-1357.
- Shin R., Schachtman D.P. (2004).** Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 101: 8827-8832.
- Shorrocks V. (1997).** The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil*. 193: 121-148.
- Smyth G.K. (2004).** Linear models and empirical Bayes methods for assesing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*. 3(1). Artículo 3.
- Smyth G.K., Speed T.P. (2003).** Normalization of cDNA microarray data. *Methods*. 31: 265-273.
- Spalding E.P., Hirsch R.E., Lewis D.R., Qi Z., Sussman M.R., Lewis B.D. (1999).** Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity: inhibition by ammonium and stimulation by sodium. *Journal of General Physiology*. 113: 909-918.

- Stangoulis J.C.R., Reid R.J., Brown P.H., Graham R.D. (2001).** Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. *Planta*. 213: 142-146.
- Takano J., Noguchi K., Yasumori M., Kobayashi M., Gajdos Z., Miwa K., Hayashi H., Yoneyama T., Fujiwara T. (2002).** Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*. 420: 337-340.
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., Von Wirén N., Fujiwara T. (2006).** The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*. 18: 1498-1509.
- Takano J., Yamagami M., Noguchi K., Hayashi H., Fujiwara T. (2001).** Preferential translocation of boron to young leaves in *Arabidopsis thaliana* regulated by the *BOR1* gene. *Soil Science and Plant Nutrition*. 47: 345-357.
- Takekoshi S., Kambayashi Y., Nagata H., Takagi T., Yamamoto Y., Watanabe K. (1995).** Activation of protein kinase c by oxidized diacylglycerols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 217: 654-660.
- Talke I.N., Blaudez D., Maathuis F.J.M., Sanders D. (2003).** CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signaling? *Trends in Plant Science*. 8: 282-293.
- Tanaka M., Wallace I.S., Takano J., Roberts D.M., Fujiwara T. (2008).** NIP6;1 is an acid channel for preferential transport of boron to growing shoot tissues in Arabidopsis. *Plant Cell*. 20: 2860-2875.
- Tang R.J., Zhao F.G., Garcia V.J., Kleist T.J., Yang L., Zhang H.X., Luan S. (2014).** Tonoplast CBL-CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 112(10): 3134-3139.

- Thor K., Peiter E. (2014).** Cytosolic calcium signals elicited by the pathogen-associated molecular pattern flg22 in stomatal guard cells are of an oscillatory nature. *New Phytologist*. 204(4): 873-881.
- Tsay Y.F., Ho C.H., Chen H.Y., Lin S.H. (2011).** Integration of nitrogen and potassium signaling. *Annual Review of Plant Biology*. 62: 207-226.
- Véry A.A., Sentenac H. (2003).** Molecular mechanisms and regulation of K⁺ transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 575-603.
- Walker D.J., Leigh R.A., Miller A.J. (1996).** Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 93: 10510-10514.
- Wang Y., Itaya A., Zhong X., Wu Y., Zhang J., Knaap E.V., Olmstead R., Qi Y., Ding B. (2011).** Function and evolution of a microRNA that regulates a Ca²⁺-ATPase and triggers the formation of phased small interfering RNAs in tomato reproductive growth. *Plant Cell*. 23: 3185-3203.
- Wang Y., Wu W.H. (2010).** Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*. 64: 451-476.
- Warrington K. (1923).** The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Annals of Botany*. 37: 629-672.
- Wegner L.H., Rashke K. (1994).** ion channels in the xylem parenchyma of barley roots. *Plant Physiology*. 105: 799-813.

- Wei Y., Bell R.W., Yang Y., Ye Z., Wang K., Huang L. (1998).** Prognosis of boron deficiency in oilseed rape (*Brassica napus*) by plant analysis. *Australian Journal of Agricultural Research*. 49(5): 867-874.
- White P.J., Bowen H.C., Demidchik V., Nichols C., Davies J.M. (2002).** Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1564: 299-309.
- Wimmer M.A., Eichert T. (2013).** Review: mechanisms for boron deficiency-mediated changes in plant water relations. *Plant Science*. 203: 25-32.
- Wimmer M.A., Lochnit G., Bassil E., Mühling K.H., Goldbach H.E. (2009).** Membrane associated, boron-interacting proteins isolated by boronate affinity chromatography. *Plant Cell Physiology*. 50: 1292-1304.
- Woods W.G. (1996).** Review of possible boron speciation relating to its essentiality. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. 9(4): 153-163.
- Wu W., Wang Y., Lee S.C., Lan W., Luan S. (2010).** Regulation of ion channels by the calcium signaling network in plant cells, en: Demidchik V., Maathuis F. (Eds.). *Ion Channels and Plants Stress Responses*, Springer-Verlag, Berlin. 111-135.
- Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002).** Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*. 165-183.
- Xu J., Li H.D., Chen L.Q., Wang Y., Liu L.L., He L., Wu W.H. (2006).** A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. *Cell*. 125: 1347-1360.

- Yamada N., Theerawitaya C., Cha-Um S., Kirdmanee C., Takabe T. (2014).** Expression and functional analysis of putative vacuolar Ca^{2+} -transporters (CAXs and ACAs) in roots of salt tolerant and sensitive rice cultivars. *Protoplasma*. 251(5): 1067-1075.
- Yoon G.M., Dowd P.E., Gilroy S., McCubbin A.G. (2006).** Calcium-dependent protein kinase isoforms in *Petunia* have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity. *Plant Cell*. 18: 867-878.
- Yu Q., Baluska F., Jasper F., Menzel D., Goldbach H.E. (2003).** Short-term boron deprivation induces increased levels of cytoskeletal proteins in maize, but not zucchini, roots apices. *Physiologia Plantarum*. 117: 270-278.
- Yu Q., Hlavacka A., Match T., Volkmann D., Menzel D., Goldbach H.E., Baluška F. (2002).** Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. *Plant Physiology*. 130(1): 415-421.
- Yuen C.C.Y., Christopher D.A. (2013).** The group IV-A cyclic nucleotide-gated channels, CNGC19 and CNGC20, localize to the vacuole membrane in *Arabidopsis thaliana*. *AoB Plants*. 5.
- Zelman A.K., Dawe A., Gehring C., Berkowitz G.A. (2012).** Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Frontiers in Plant Science*. 3. Artículo 95.
- Zhang X.C., Gao H.J., Wu H.H., Yang T.Y., Zhang Z.Z., Mao J.D., Wan X.C. (2015).** Ca^{2+} and CaM are involved in Al^{3+} pretreatment-promoted fluoride accumulation in tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 96: 288-295.

Zhao Y.X., Medrano L., Ohashi K., Fletcher J.C., Yu H., Sakai H., Meyerowitz E.M. (2004). HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 16: 2586-2600.

Zhu S.Y., Yu X.C., Wang X.J., Zhao R., Li Y., Fan R.C., Shang Y., Du S.Y., Wang X.F., Wu F.Q., Xu Y.H., Zhang X.Y., Zhang D.P. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19: 3019-3036.

